Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Immunologische Verfahren zur Bestimmung von Apolipoproteinen im Methodenvergleich und als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Pils
aus Karlsruhe

1984

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Immunologische Verfahren zur Bestimmung von Apolipoproteinen im Methodenvergleich und als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Pils
aus Karlsruhe

1984

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. R. Karsch

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Meinen hochverehrten Eltern in Dankbarkeit
gewidmet

Besonderen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. M. Eggstein für die Überlassung des Themas, den Herren Privatdozenten Dr. Dr. W. Stein und Dr. J. Bohner für die freundliche, großzügige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.
Herrn Dr. R. Maulbetsch danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und nicht zuletzt Herrn Prof. Dr. D. Jeschke vom Sportmedizinischen Institut für die Überlassung der Sportlerseren.

Abstract

Wolfgang Pils

Immunologische Verfahren zur Bestimmung von Apolipoproteinen im Methodenvergleich und als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko.

An 305 Serumproben, die von stationären und ambulanten Patienten beiderlei Geschlechts der Med. Universitätsklinik und von männlichen Sportlern stammen, werden immunologische Methoden (Apo A und Apo B Behring-Laser-Nephelometer, Apo A und Apo B M-Partigen®-Platten Behring und Apo AI, Apo AII und Apo B Immuno Video-Nephelometrie) miteinander verglichen, nachdem anhand der Cholesterin- und Triglyzeridwerte in 7 Klientelgruppen eingeteilt worden war. Am Sportkollektiv wird zusätzlich die Lipoproteinelektrophorese (α-,β-Chol) mit den Apolipoproteinen verglichen. Außerdem werden die Apolipoproteine als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko diskutiert.

Neben guten Präzisionskontrollen (Ausnahme: Apo AII-Im) erweisen sich die Richtigkeitskontrollen als standardisierungsbedürftig. Die selbst erstellten Referenzwerte stimmen mit den Firmenangaben weitgehend überein (Ausnahme: Apo AI, AII und B Immuno). Auch diese werden 1983 von der Firma so modifiziert, daß gute Übereinstimmung mit den eigenen Referenzwerten besteht. Alle Methoden halten einer Linearitätsprüfung über den gesamten Meßbereich stand. Hämoglobin und Bilirubin stören die Apo A-LN- und Apo B-LN-Bestimmung nicht. Die Lagerung von Serumproben ist unkritisch.
Die Methoden werden mit dem Student-t-Test, Korrelationen und Histogrammen miteinander verglichen.
Beim Mittelwertvergleich für das Gesamtkollektiv unterscheiden sich die Apo A- und Apo B-Methoden untereinander. Die Regression der 3 Apo B-Methoden auf das Gesamtcholesterin beweist einen engen Zusammenhang. Gleiches gilt für die 3 Apo B-Methoden untereinander. Unterschiedlich sind die Korrelationen der Apo A-Methoden im Vergleich.
Bei der Betrachtung der Einzelgruppen ist die Vergleichbarkeit aller Methoden ebenfalls unterschiedlich gut.
Für das Sportkollektiv finde ich nur mäßige Übereinstimmung von Apo B mit β-Chol im Vergleich zum Referenzkollektiv und schlechte Korrelationen von Apo A mit α-Chol.
Anhand von Histogrammen wird festgestellt, daß die Apo A-Methoden wenig zur Differenzierung der "Grauzone" beitragen. Dagegen eignen sich die Apo B-Methoden zur Unterscheidung "hohes Chol" vom Referenzkollektiv und mit Einschränkung (Apo-B-Im) "Grauzone" vom Referenzklientel.
Sportler können mit keinem Apolipoprotein vom Referenzkollektiv unterschieden werden.
Das Verhältnis Apo B/Apo A als Diskriminator für ein atherogenes Risiko bleibt weit hinter den Erwartungen zurück.
Feinrasterdiagnostik mit Apo A und Apo B ist methodisch möglich. Wichtigster Diskriminator ist Apo B. Da man jedoch mit den verschieden Methoden zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen gelangt (Firmenabhängigkeit), scheinen Standardisierungsmaßnahmen dringend nötig. Zum jetzigen Zeitpunkt kann Apo A und Apo B zur Feinrasterdiagnostik für die Routine noch nicht sinnvoll genützt werden.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Nomenklatur und methodischer Überblick	2
1.2	Stoffwechsel der Plasmalipoproteine	4
1.3	Bedeutung der HDL-Serumkonzentration	6
1.4	Bedeutung der LDL-Serumkonzentration	6
1.5	Problemstellung	7
2.	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.2	Methoden	10
2.2.1	Cholesterin-Bestimmung	10
2.2.2	Triglyzerid-Bestimmung	10
2.2.3	Apolipoproteine AI-Im, AII-Im, B-Im (immunoneph)	11
2.2.4	Apolipoproteine A-LN und B-LN (Behring-Laser-Nephelometer)	13
2.2.5	Apolipoproteine A-Pa und B-Pa (Behring, RID)	16
2.2.6	HDL-Cholesterin	18
2.2.7	LDL-Cholesterin	19
2.2.8	Lipoproteinelektrophorese (Immuno)	19
2.3	Abkürzungen	22
3.	Ergebnisse	23
3.1	Qualitätskontrollen	23
3.1.1	Präzisionskontrollen	23
3.1.2	Richtigkeitskontrollen	26
3.2	Linearitätsprüfungen	27
3.3	Referenzwerte	32
3.4	Einfluß von Hämoglobin und Bilirubin auf die Apolipoprotein-Bestimmung	33
3.4.1	Hämoglobin	33
3.4.2	Bilirubin	35

		Seite
3.5	Stabilitäts- und Haltbarkeitsprüfungen von Lipoproteinen und Apolipoproteinen	37
3.5.1	Raumtemperatur (20°C)	37
3.5.2	Kühlschranktemperatur (4°C)	38
3.5.3	Gefrierschrank (-20°C) und Gefriertruhe (-70°C)	38
3.5.4	Zusammenfassung	45
3.6	Methodenvergleich (Student-t-Test)	46
3.6.1	für das Gesamtkollektiv	46
3.6.2	für die einzelnen Klientelgruppen	47
3.7	Methodenvergleich (Korrelationen)	50
3.7.1	Korrelationskoeffizienten des Gesamtkollektivs	50
3.7.2	Korrelationskoeffizienten der Gruppen 1-7	51
3.7.3	Zusammenfassung	57
3.8	Vergleich der Gruppen mit Histogrammen	58
3.8.1	Apo B-LN	58
3.8.2	Apo B-Pa	60
3.8.3	Apo B-Im	60
3.8.4	Apo A-LN-Fä	63
3.8.5	Apo AI-Im	65
3.8.6	Apo AII-Im	66
3.9	Gruppenvergleich mit Darstellung der Quotienten Apo B/Apo A	69
3.9.1	Das Verhältnis Apo B-LN/Apo A-LN-Fä und Apo B-Pa/Apo A-Pa	69
3.9.2	Das Verhältnis Apo B-Im/Apo AI-Im	71
3.10	Differenzierung der Grauzone mit Apo A und Apo B	73
3.10.1	Feinrasterdiagnostik mit Apo B-LN und Apo A-LN	73
3.10.2	Feinrasterdiagnostik mit Apo B-Pa und Apo A-Pa	75
3.10.3	Feinrasterdiagnostik mit Apo B-Im und Apo AI-Im	75

		Seite
3.10.4	Feinrasterdiagnostik mit Apo B-Im und Apo AI-Im anhand der 1983 modifizierten Referenzwerte	76
3.11	Differenzierung der "Grauzone" beim Vergleich Apo B-LN und Apo B-Im	77
4.	Diskussion	79
4.1	Methodenvergleich	79
4.1.1	Qualitätskontrollen	79
4.1.1.1	Präzisionskontrollen	79
4.1.1.2	Richtigkeitskontrollen	80
4.1.2	Linearitätsprüfung	80
4.1.3	Referenzwerte	81
4.1.4	Einfluß von Hämoglobin und Bilirubin auf die immunologischen Methoden	81
4.1.4.1	Hämoglobin	81
4.1.4.2	Bilirubin	81
4.1.5	Stabilität von Lipoproteinen	82
4.1.6	Methodenvergleich (Stdent-t-Test)	83
4.1.7	Methodenvergleich (Korrelationen)	84
4.2	Unterschiede der Apo A- und Apo B-Methoden beim Gruppenvergleich mittels t-Test, Histogrammen und Korrelationen	85
4.2.1	Mittelwertvergleich der Gruppen	85
4.2.2	Korrelationen der Gruppen	86
4.2.3	Vergleich mit Histogrammen	87
4.3	Das Verhältnis Apo B/Apo A	89
4.4	Feinrasterdiagnostik mit Apo A und B	90
4.5.	Praktische Schlußfolgerungen	91
5.	Zusammenfassung	92
6.	Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

Über 50% aller Todesfälle in den industrialisierten Ländern sind auf Herz- und Gefäßerkrankungen zurückzuführen. Das heißt, daß mehr als die Hälfte der in einer modernen Zivilisation lebenden Menschen an degenerativen Gefäßerkrankungen sterben. (86)
Während der Herzinfarkt in den Nachkriegsjahren eine Seltenheit war, steht er mit steigendem Wohlstand in der Todesursachenstatistik der BRD und anderer Industriestaaten an erster Stelle. (5)

Für die kardiovaskulären Erkrankungen sind Risikofaktoren bekannt. Sie Stehen in enger Korrelation zu der Wahrscheinlichkeit, an Atherosklerose zu erkranken. Nach dem Schweregrad wird in Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung eingeteilt. (45,64,81,88,101)

Risikofaktoren 1. Ordnung:	Hyperlipoproteinämie
	Rauchen
	Hypertonie
Risikofaktoren 2. Ordnung:	Übergewicht
	Bewegungsmangel
	Streß
	Diabetes mellitus
	Hyperurikämie
	Polyzythämie

Besonders Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie tragen wesentlich zur Beschleunigung atherosklerotischer Gefäßprozesse bei.
Deshalb ist eine frühzeitige Erkennung und Behandlung von Hyperlipidämien einer der wichtigsten Aspekte in der Prävention der koronaren Herzkrankheit und anderer atherosklerotischer Gefäßerkrankungen.
Als unbestrittenes Basisprogramm dient hierzu die Bestimmung des Gesamtcholesterin und der Triglyzeride aus dem Nüchternserum. Bald zeigte sich, daß diese beiden Parameter alleine nicht mehr ausreichten, um ein so

kompliziertes System von Makromolekülen, wie es die Lipoproteine darstellen, zu differenzieren. So kam der Entwicklung zusätzlicher, angeblich aussagekräftiger diagnostischer Verfahren wachsende Bedeutung zu, nämlich der Analyse der einzelnen Serum-Lipoproteinfraktionen.

1.1 Nomenklatur und methodischer Überblick

Die Lipoproteine im menschlichen Plasma bilden eine heterogene Ansammlung von Partikeln. Sie wurden in den letzten Jahren von mehreren Standpunkten aus beleuchtet und klassifiziert.

I. Einteilung nach der hydratisierten Dichte mittels Ultrazentrifuge: (27,61)
   - Chylomikronen
   - high density lipoprotein (HDL)
   - low density lipoprotein (LDL)
   - very low density lipoprotein (VLDL)

II. Einteilung in Klassen verschiedener elektrophoretischer Mobilität: (39,73,98)
   - α-Lipoprotein (α-Lp)
   - β-Lipoprotein (β-Lp)
   - prä-β-Lipoprotein (prä-β-Lp)

III. Einteilung nach ihren Apolipoproteinanteilen mit Hilfe immunologischer Methoden:
   - Apolipoprotein A (Apo A)
   - Apolipoprotein B (Apo B)
   - Apolipoprotein C (Apo C)
   - Apolipoprotein D (Apo D)
   - Apolipoprotein E (Apo E)

   sowie Unterklassen.

Die Hauptapoproteine der α- und β-Lipoproteine bezeichnet man als Apo A bzw. Apo B. Die prä-β- Lipoproteine enthalten hauptsächlich Apo B und Apo C. (26,49,55,59,65)
In den letzten Jahren wurde eine vierte Methode entwickelt, um auf einfache Weise einzelne Lipoproteine, die auf den Gehalt an Gesamtlipoproteinen Rückschlüsse erlauben,

zu bestimmen.

IV. Einteilung und Bestimmung mit Präzipitationsverfahren:

HDL-Cholesterin (HDL-Chol)

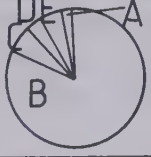
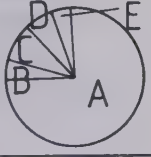
LDL-Cholesterin (LDL-Chol)

Bei diesen sogenannten "Präzipitationsverfahren" werden einerseits die Apolipoprotein B haltigen Lipoproteine geringer Dichte (LDL und VLDL) spezifisch gefällt (Polyanionen) und abzentrifugiert. In der im Überstand enthaltenen HDL-Fraktion wird deren Cholesterinanteil ermittelt und als HDL-Cholesterin bezeichnet. (5,8,29,63,72, 87,91,93)

Andererseits fällt man die Lipoproteine geringer Dichte (LDL) alleine mit Heparin und bestimmt wieder Cholesterin im Überstand. Daraus kann man das LDL-Cholesterin berechnen: (97)

LDL-Chol = Gesamt-Chol - Chol i.Ü.

Einen Überblick über die verschiedenen Nomenklaturen gibt Abb. 1 (21,60,82,100)

Ultrazentrifuge/Dichte	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Elektrophorese	Auftragszone	prä-β	β	α
Apolipoproteine				

Zusammensetzung

Proteinanteil	1%	8-10%	20%	50%
Phospholipide	4%	18%	23%	30%
Cholesterin	6%	19%	45%	18%
Triglyzeride	85-90%	50%	10%	2-5%

Abb.1 Einteilung der Human-Plasmalipoproteine und deren Zusammensetzung sowie die Apolipoproteine. mod. nach Schlierf

1.2 Stoffwechsel der Plasmalipoproteine

Entscheidende Fortschritte der Lipoproteinforschung ermöglichen es heute, ein recht deutliches Bild von der Rolle veränderter Lipoproteinmuster bei der Atherogenese zu zeichnen. Lipide müssen im wässrigen Milieu des Blutes in Form von Lipoproteinen transportiert werden. Beginnend mit den Untersuchungen von Fredrickson und seiner Arbeitsgruppe wurden im letzten Jahrzehnt folgende wichtige Erkenntnisse über den Stoffwechsel der Lipoproteine gewonnen:

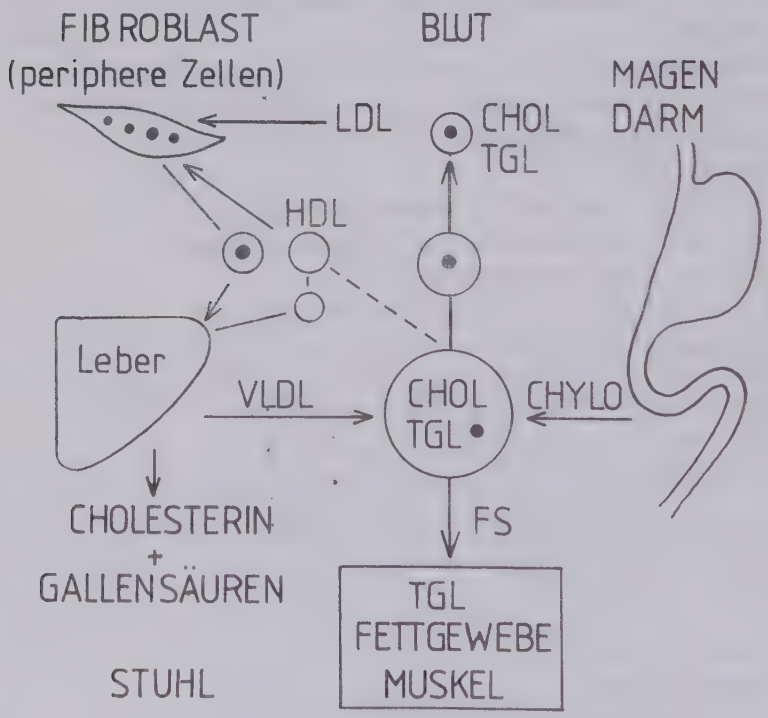


Abb.2 Schematische Darstellung des Lipoproteinstoffwechsels. Details:siehe Text. (Chylo=Chylomikronen, VLDL=very low density Lipoproteine, LDL=low density Lipoproteine, HDL= high density Lipoproteine, Chol=Cholesterin, TGL=Triglyzeride, ● =Cholesterinmolekül)

Chylomikronen transportieren die langkettigen Fettsäuren der Nahrung in Form von Triglyzeriden aus dem Darm ins Blut. Die VLDL werden von der Leber abgegeben und transportieren in der Leber gebildete Triglyzeride zu den peripheren Organen (z.B. Muskeln). Im Blut werden die Chylomikronen und die VLDL unter dem Einfluß von Enzymen wie Lipoproteinlipasen und Lezithin-Cholesterin-Azyl-Transferase in ihrer Zusammensetzung verändert und zu LDL abgebaut. Die LDL geben das Cholesterin an die peripheren Zellen unter anderem als Baustein für die Zellmembranen ab, gleichzeitig wird dadurch die Synthese von Cholesterin in der Zelle nach dem Prinzip der Feed-Back-Hemmung reguliert. Der Grad der Anhäufung von Cholesterin in der Arterienwand ist durch mehrere Faktoren bestimmt, nämlich durch den Transport von Lipoproteinen aus dem Blut in die Arterienwand, durch die Ablagerung, die Verstoffwechslung und den Abtransport aus der Arterienwand. Die Vorstufen der HDL werden nach bisherigen Informationen von der Leber an das Blut abgegeben und verändern ihre Zusammensetzung durch einen Austausch von Proteinkomponenten mit den triglyzeridreichen Lipoproteinen, VLDL und Chylomikronen bei deren Abbau im Blut. Es sind mehrere Unterfraktionen der HDL bekannt, von denen vor allem die Fraktion HDL_2 bei einem vermehrten Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen(VLDL und Chylomikronen) beteiligt ist und deshalb in ihrer Konzentration im Blut ansteigt. Die HDL transportieren außerdem Cholesterin von den peripheren Zellen zurück zur Leber, dem wichtigsten Ort für den Abbau von Cholesterin und die Ausscheidung in Form von Gallensäuren. (21,60,82,84)

1.3 Die Bedeutung der HDL-Serumkonzentration

Die HDL haben in den letzten Jahren großes Interesse erweckt, seitdem eine negative Korrelation zwischen HDL und dem Risiko der koronaren Herzkrankheit erkannt wurde. (16,43,44,46,69.71) Miller und Miller (1975) lieferten einen wertvollen Beitrag zur Klärung dieser Zusammenhänge. Nach ihren Befunden könnte eine Verminderung der HDL im Plasma den Abtransport des Cholesterins aus der Arterienwand verschlechtern und dadurch eine Entwicklung einer Atherosklerose begünstigen. (68) Diese These wurde auch durch Ergebnisse der Framingham-Studie gestützt. (45) Ähnliche Resultate fanden Castelli et al (1977) und Glomset (1968). (24,42) Auch andere Autoren diskutierten die Funktion der HDL. Dabei sollen die Mechanismen, Hemmung des Eindringens atherogener Lipoproteine in die Zellen der Gefäßwand und die Steuerung des Abbaus triglyzeridreicher Lipoproteine im Plasma, für die protektive Rolle der HDL verantwortlich sein. (23,74,102) Noch ist nicht gesichert, welche Bestandteile der HDL für die verschiedenen Mechanismen ihrer antiatherogenen Wirkung verantwortlich sind. Jedoch belegen Befunde aus großen epidemiologischen Studien die eindeutige Funktion der HDL als Schutzfaktor, "gute Lipoproteine". (15,24,45,68)

1.4 Die Bedeutung der LDL-Serumkonzentration

LDL sind gefürchtet wegen ihres hohen atherogenen Potentials. Es besteht eine positive Korrelation zwischen LDL und koronarer Herzkrankheit. Epidemiologische, klinische und biochemische Befunde sprechen für eine direkte kausale Rolle der LDL in der Pathogenese der Atherosklerose. (16,24,25,68,69,70) Aufgrund dieser und anderer Studien kann man LDL als Risikofaktor, "böse Lipoproteine", bezeichnen.

1.5 Problemstellung

Die Erforschung der strukturellen und metabolischen Eigenschaften der Apolipoproteine hat im letzten Jahrzehnt bedeutende Fortschritte erzielt. Daniel Steinberg, Stoffwechselexperte an der University of California in San Diego, stellte Ende 1979 fest: "Wir sind von der Cholesterin-Ära zur Lipoprotein-Ära gekommen und treten nun in die Apolipoprotein-Ära ein." (89)
Aller Wahrscheinlichkeit nach stellt der Proteinanteil von Lipoproteinen den einzigen bestimmten biochemischen Marker von Lipoproteinen dar. (1) Hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen Patienten, die zur Atherosklerose neigen, und gesunden Kontrollpersonen ist dieser Anteil wichtiger als die Lipidkomponente von Lipoproteinen. Alaupovic et al (1972) führten deshalb den Begriff der Lipoproteinfamilien ein. (2) Nach diesem Konzept sind Lipoproteinfamilien Einheiten, die identische Proteinanteile besitzen. In Tab. 1 sind die wichtigsten Apolipoproteine und deren Vorkommen in Lipoproteinfraktionen, nach Kostner mod. aufgezeigt. (57)

Apolipoprotein	Dichteklasse	Elektrophorese	Mol.-Gew.x10^{-3}
AI	HDL	α	28
AII	HDL, VLDL	α	17
B	LDL, VLDL	β,prä-β	270
CI	VLDL, Chylo und HDL	prä-β	7
CII			10
CIII			10
D (AIII)	HDL_3,(LDL)	α	22
E_{1-3}	VLDL,LDL,HDL	prä-β,α	37

Tab. 1 Zusammenstellung der wichtigsten Apolipoproteine und Vorkommen in Lipoproteinfraktionen (mod. nach Kostner (57))

Die hauptsächlichen Proteinanteile von menschlichen HDL sind das Apo A bzw. die Apo AI und Apo AII. Aufgrund neuerer Befunde muß man davon ausgehen, daß eine erniedrigte Serumkonzentration von Apo A oder besser Apo AI in hohem Maße für das Erscheinen von koronarer und peripherer Atherosklerose ausschlaggebend ist. (75,90) Somit dürfte die antiatherogene Wirkung von HDL im wesentlichen auf dem Apo AI-Gehalt, aber nicht auf dem Apo AII-Anteil beruhen. (58)
Auf der anderen Seite ist Apo B das hauptsächliche Apolipoprotein von cholesterinreichen LDL und damit zugleich ein Maß für die Absolutkonzentration dieses Lipoproteins, das an menschlichen Gefäßzellen zytotoxische Erscheinungen hervorzurufen vermag. Deren Entwicklung kann durch HDL nur dann gebremst werden, wenn die Konzentration von LDL-Chol eine gewisse Höhe nicht überschreitet. (66)
So wächst die Erkenntnis, daß die Konzentrationen von Apolipoproteinen sicherere Bezugsgrößen bezüglich eines Erkrankungsrisikos an atherosklerotischen Veränderungen sind als die von Lipoproteinen im Serum.

In der vorliegenden Studie sollen verschiedene immunologische Methoden der Apolipoprotein-Bestimmung untereinander verglichen und an einem ausgewählten Patientengut untersucht werden. Die Tests der Firmen sind alle käuflich zu erwerben.
Weiter soll geprüft werden, ob die benutzten immunologischen Verfahren zur Apo A und Apo B-Bestimmung eine weitere Differenzierung im Rahmen einer Risikovorhersage ermöglichen, wenn man von der Gesamtcholesterin- und Triglyzerid-Bestimmung als Basisprogramm ausgeht und die Klientele danach einteilt.
Schließlich sollen für "unklare" Patienten Entscheidungsgrenzen anhand der Apo A- und Apo B-Konzentrationen festgelegt und das Verhältnis Apo B/Apo A beleuchtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Vom 27.7.81 bis 30.10.81 werden Seren von stationären Patienten und Patientinnen der Medizinischen Universitätsklinik und deren Ambulanzen, sowie von Sportlern und Probanden aus meinem Feundeskreis gesammelt. Es handelt sich dabei um keinen repräsentativen Bevölkerungsquerschnitt, sondern um ein Patienten- und Probandengut, das an Hand der gefundenen Cholesterin- und Triglyzeridwerte in verschiedene Klientelgruppen eingeteilt wird.
Das Sportkollektiv besteht aus männlichen, 25-50 jährigen Läufern, die mindestens zweimal wöchentlich trainieren.

Für die Bestimmung werden ausschließlich Nüchternseren nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz verwendet, die ich nach Absetzen des Blutkuchens durch Zentrifugieren erhalte (10 min bei 3 000 U/min). Anschließend werden die Proben portioniert und bei -20°C eingefroren.
Um eine derartige Aufbewahrungsart zu rechtfertigen, führe ich vorher Stabilitäts- und Haltbarkeitsprüfungen (siehe Kap. 3.5) für die im folgenden beschriebenen Bestimmungen durch.

Gruppeneinteilung an Hand der gefundenen Cholesterin- und Triglyzeridwerte:

Gruppe 1	n= 103	Chol <220mg/dl	TGL <175mg/dl
		(Referenzkollektiv)	
Gruppe 2	n= 71	Sportler	
Gruppe 3	n= 20	Chol <150mg/dl	TGL <150mg/dl
Gruppe 4	n= 20	Chol <220mg/dl	TGL >200mg/dl
Gruppe 5	n= 20	Chol > 300mg/dl	TGL <175mg/dl
Gruppe 6	n= 20	Chol > 300mg/dl	TGL >175mg/dl
Gruppe 7	n= 51	Chol 220-300mg/dl	TGL normal bis erhöht (sogenannte "Grauzone")

Folgende Laborparameter werden bestimmt:
Cholesterin, Triglyzeride, Apo A-LN, Apo A-LN mit Fällung, Apo B-LN, Apo A-Partigen, Apo B-Partigen, Apo AI-Im, Apo AII-Im, Apo B-Im, beim Sportlerkollektiv zusätzlich die Lipoproteinelektrophorese. Außerdem HDL- und LDL-Chol im Rahmen der Vorversuche.

2.2 Methoden

2.2.1 Cholesterin

Messung der Gesamtcholesterinkonzentration mit einem Multi-Auto-Analyser SMA^{R} 12/60 der Firma Technicon nach der CHOD-PAP-Methode (Chol-Esterase/Chol-Oxidase-Farbreaktion). Es werden Automatenpackungen der Firma Boehringer/Mannheim verwendet. (4,17,18,38,56,79)

2.2.2 Triglyzeride

Messung der Neutralfettkonzentration ebenfalls mit einem SMA^{R} 12/60 nach dem vollenzymatischen UV-Test der Firma Boehringer/Mannheim. (20,33,34,78)

2.2.3 Apolipoprotein AI immunoneph
Apolipoprotein AII immunoneph
Apolipoprotein B immunoneph

Messung von Apo AI, Apo AII und Apo B mit einem Immuno-Video-Nephelometer (Immuno GmbH, Heidelberg) bestehen aus:

Nephelometer
Videoeinheit
Drucker

Prinzip;
Das Immuno-Video-Nephelometer dient zur quantitativen Bestimmung von Proteinen im Serum, unter Verwendung der lichtstreuenden Eigenschaften von Immunkomplexen. Als Lichtquelle dient eine Wolframlampe (Wellenlänge 600>nm).
Zur Konzentrationsbestimmung benützt man Kalibrationskurven, die mit einem Standardserum erstellt werden.

Reagentien: (Immuno)
1. PEG Pufferkonzentrat 40% Lot No.0706/011
2. Immunoneph Referenzstandard (enthält Apo AI, Apo AII und Apo B) Lot No. 0530/03
3. Antiseren a) Anti-Human Apo AI (Ziege)
b) Anti-Human Apo AII (Kaninchen)
c) Anti-Human Apo B (Ziege)
Lot No. 2031/03, Lot No. 2041/04, Lot No. 2051/03
4. Kontrollserum Lot No. 063101
5. NaCl-Lösung 0,9%

Durchführung:
1. Das PEG Pufferkonzentrat 40% wird mit dest. H_2O 1:10 verdünnt.
2. Das Standardserum wird mit dest. H_2O rekonstruiert.
3. Die Antiseren werden, wie in der Übersicht angegeben, mit PEG Puffer verdünnt.
4. Die Serum- und Kontrollproben verdünnt man mit 0,9%NaCl.
5. Reaktionsansätze und Messung:
In Einmalteströhrchen (Borsilicatglas) werden die

Ansätze hergestellt und in sogenannten "mixing racks" gemischt. Außer Bestimmungsansätzen (Antiserum und Probenverdünnung) führt man auch Probenleerwerte(PEG-Pufferlsg. und Probenverdünnung) für jede Messung mit. Nach Erreichen des Reaktionsendpunktes gibt man jedes Teströhrchen einzeln in die Meßzelle (Wolframlampe > 600nm). Die gebildeten Immunkomplexe streuen das entlang der Längsachse des Teströhrchens einfallende Licht. Das Streulicht wird von zwei Fotodetektoren, die im rechten Winkel zur Einfallsachse des Lichtstrahls angebracht sind, gemessen. Das elektrische Signal der Fotodetektoren ist der Streulichtintensität direkt proportional und wird in Streulichteinheiten (Light Scattering Units, LSU) digital angezeigt. Die Probenleerwerte werden vom Microcomputer direkt vom Bestimmungsansatz subtrahiert, die gefundenen LSU gespeichert.

6. Auswertung

Aus den Messwerten der Standard-Verdünnungen berechnet das Gerät eine Referenzkurve, die auf der Videoeinheit optisch dargestellt wird. Die für die Proben erhaltenen Meßwerte werden an Hand der Referenzkurve in Konzentrationen umgerechnet und mit dem angeschlossenen Drucker ausgedruckt. (51,53)

Vorgehen (Übersicht):

	Standard-verdünnungen	Antiserumverd.	Probenverd.	Stand.-Vol Proben-Vol	Antiserum Vol
Apo AI	1:100-1:400	1:20	1:100	25 µl	1 ml
Apo AII	1: 25-1:200	1:15	1:100	50 µl	1 ml
Apo B	1: 25-1:200	1:60	1:100	100 µl	1 ml

2.2.4 Apolipoprotein A-BLN (Behring Laser Nephelometrie)
Apolipoprotein B-BLN

Messung von Gesamt-Apo A, Apo B und Apo A der HDL-Fraktion mit dem kompletten Behring Laser-Nephelometrie-System (Behringwerke, Frankfurt/Main) bestehend aus:

Behring Laser Nephelometer
BLN-Transportautomatik
BLN-Probenautomatik
Tischrechner HP 9815 A/S

Das Behring Laser Nephelometer in seiner vollautomatisierten Ausbaustufe dient der schnellen, rationellen und einfachen Bestimmung von Proteinen im Serum. Die arbeitsintensiven Probenvorbereitungsschritte, wie Verdünnen der Proben, Herstellen der Verdünnungsreihen für Referenzkurven sowie die eigentliche Messung und die Berechnung der Konzentrationen, werden vom Gerät selbsttätig durchgeführt.

Prinzip:
Mit dem Gerät bestimmt man die Konzentrationen von Apo A und Apo B mit Hilfe von Antigen/Antikörper-Reaktionen und quantitativer nephelometrischer Messung der Antigen/Antikörper-Komplexe, die bei dieser Reaktion gebildet werden. Als Lichtquelle dient ein He-Ne-Laser (623,8 nm). Zur Konzentrationsermittlung werden Referenzkurven verwendet, die mit Standardseren erstellt werden.

Reagentien (Behringwerke, Frankfurt/M.):
1. LN-Phosphatpuffer-Konzentrat
2. Standardseren: Apolipoprotein A Standard (lyoph.)
K.-/ Lot No. 041202 R (106mg/dl)
Apolipoprotein B Standard (flüssig)
K.-/ Lot No. 042218 A (72mg/dl)
3. Antiseren: LN-Anti A (Kaninchen) K.-/ Lot No. 13855
LN-Anti B (Kaninchen) K.-/ Lot No. D4901C
4. NaCl-Lösung 0,9%
5. Lipoprotein-Fällungsreagenz (PWS/Mg^{++})

Vorgehen (Übersicht):
Verdünnungen-Reaktionsvolumina-Reaktionszeiten

	Standard-Verdünnung	Antiserum-Verd.	Proben-Verd.	Standard+Proben-Volumen	Antiserum Vol.	Reaktionszeit
Apo A	1:10-1:320	1:5	1:101	50 µl	200µl	30'
Apo B	1:10-1:320	1:5	1:101	100 µl	200µl	30'

Durchführung:
1. Das Apo A-Standard-Serum human wird mit dest. H_2O rekonstruiert, der Apo B-Standard liegt schon flüssig vor.
2. Die Antiseren verdünnt man mit 0,9% NaCl-Lösung und filtriert durch ein Membran-Filter (0,45µm).
3. Die Serum- und Standard-Proben für Apo A werden mit 0.9% NaCl, die für die Apo B Bestimmung mit 1:11 vorverdünntem LN-Phosphat-Puffer-Konzentrat verdünnt.
4. Die Patientenproben für die Apo A Bestimmung werden mit Lipoprotein-Fällungsreagenz (PWS/Mg^{++}) vorbehandelt und der Überstand bzw. Unterstand (bei triglyzeridreichen Seren) zur Messung eingesetzt. Außerdem bestimme ich Gasamt-Apo A ohne Fällung und Apo B.
5. Herstellen von Verdünnungen mit der Pipettierstation:
Die unverdünnten Serum- bzw. Standard-Proben werden in Einmalgefäße gefüllt und mit Hilfe von Kasetten automatisch zur Pipettierstation tranportiert. Dort entnimmt ein Dilutor mit einer beweglichen Kanüle die vorprogrammierten Serum- bzw. Standardvolumina, versetzt diese mit den ebenfalls vorprogrammierten Verdünnungsflüssigkeitsvolumina und durchmischt die Inhalte. Alle Verdünnungen werden in einer Serumblockkasette zwischengespeichert. Von den Standards wird automatisch eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt.
6. Reaktionsansätze und Messung:
Vom Zwischenspeicher werden die gewünschten Proben- bzw. Antiserumvolumina von der Tranferierstation in Einmalküvetten (Kunststoff) pipettiert und gemischt. Nach einer

Reaktionszeit von 30 min erreichen die mit Einmalküvetten besetzten Kasetten über die Transportautomatik das eigentliche Lasernephelometer. Nur das von den AG/AK-Komplexen besonders intensiv in Vorwärtsrichtung gestreute Licht wird mit einem Linsensytem auf eine Photodiode gebündelt. Ein Digitalvoltmeter registriert das Photodiodensignal. Nach der Messung werden die Küvetten in einem Ablaufspeicher gesammelt. Als Anmerkung sei erwähnt, daß es sich nicht um eine Endpunktmessung handelt und deshalb die Reaktionszeit genau beachtet werden muß, falls man nicht mit der BLN-Transportautomatik arbeitet.

7. Auswertung:

Aus den Meßdaten der Standard-Verdünnungen berechnet und erstellt der angeschlossene Rechner (HP 9815 A/S) eine Referenzkurve. Die Meßwerte der Proben werden mit Hilfe der Referenzkurve in Konzentrationen umgerechnet und ausgedruckt.(11,12,50,85)

2.2.5 M-Partigen^{R} Apolipoprotein A
M-Partigen^{R} Apolipoprotein B
(Behringwerke, Frankfurt/M.)

Prinzip:
Diese radialen Immundiffusionsplatten (RID) der Firma Behring zur quantitativen Bestimmung enthalten in einer gebrauchsfertigen Agarosegelschicht ein spezielles Antiserum gegen Apolipoprotein A bzw. Apolipoprotein B.
Nach Beschicken der Platten mit Standards, Kontrollproben und Patientenproben werden die Platten verschlossen und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Erreichen des Diffusionsendpunktes wird an Hand einer erstellten Bezugskurve ausgewertet.

Vorgehen (Übersicht):

	Proben-volumen	Proben-Verdünnung	Standard-volumen	Standard-Verdünnung	Diffus. zeit
Apo A	5 µl	1:5	5 µl	1:1,1:2,1:4	2Tage
Apo B	5 µl	1:2	5 µl	1:1,1:2,1:4	5Tage

Durchführung:
1. Vom Apo A Standard-Serum (human) bzw. Apo B Standard-Serum (human) stellt man die in der Übersicht genannten Verdünnungsstufen her.(Lot No. 041202 R, Lot No. 042218 A)
2. Beschicken der Platten:
Auftragsstellen 1-3 je 5µl der 3 Standardverdünnungen,
Auftragsstellen 4-12 je 5µl der Patienten oder Kontrollen in der oben genannten Verdünnung.
3. Die Diffusionszeit beträgt für Apo A 2 Tage, für Apo B 5 Tage (Raumtemperatur).
4. Nach Ablauf der Diffusionszeit werden die Durchmesser der Präzipitate mit einer Meßlupe, einem Meßprojektor oder einem Meßlineal gemessen und quadriert.

5. Erstellen der Bezugskurve:
Die quadrierten Ringdurchmesser (D^2) der mit den Standardverdünnungen erhaltenen Präzipitate werden auf linearem Milimeterpapier als Funktion der Konzentration aufgetragen.
Es resultiert eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate bei 11,5$\pm$ 2,5 liegt. Die Werte der Patientenproben werden über die Bezugskurve ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Es ist außerdem eine Auswertung nach Tabelle mit Bezugswerten möglich.
6. Anmerkung:
Für den Meßbereich gelten Präzipitationsdurchmesser von 4-9 mm. Proben außerhalb des Geltungsbereichs werden mit entsprechend höherer oder niederer Konzentration der Proben wiederholt. (13,14)

2.2.6 HDL-Cholesterin

Messung der HDL-Cholesterinkonzentration (High-Density-Lipoproteins) mit Phosphorwolframsäure/Mg^{++}-Fällung und anschließender Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Überstand mit einem ACA (Automatic Clinical Analyser).

Prinzip:
Durch Zugabe von PWS und Magnesiumionen zur Probe werden Chylomikronen, VLDL und LDL präzipitiert. Nach Zentrifugation verbleiben im Überstand HDL, deren Cholesterinkonzentration enzymatisch bestimmt wird.

Reagentien:
1. Testkombination HDL-Chol, Fällungsreagenz der Firma Boehringer/Mannheim bestehend aus Lösung 1: PWS 4,8 g/dl und Lösung 2: $MgCl_2$ 3 mol/l (Nr. 1270214)
2. Fertige Testpacks der Firma Du Pont Company für einen ACA zur HDL-Cholesterinbestimmung

Durchführung:
1. Man erhält das fertige Fällungsreagenz durch Mischen von 5 Volumenteilen Lösung 1 (PWS) mit 1 Volumenteil der Lösung 2 ($MgCl_2$).
2. Zum Fällungsschritt versetze ich 50µl Fällungsreagenz mit 500µl Serum (Mikromethode). Dieser Reaktionsansatz wird 30 sec in einem Rüttler durchmischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2 min lang scharf in einer Tischzentrifuge der Firma Eppendorf (Nr. 3200) bei 12000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wird zur HDL-Cholesterin-Bestimmung eingesetzt.
3. Vollmechanisiert bestimmt man anschließend das HDL-Chol in einem ACA II (Du Pont Instruments, Wilmington, Delaware 19898) photometrisch. Dazu wird eine Cholesterin-Esterase/Cholesterin-Oxidase/Peroxidase gekoppelte Reaktion benützt, wobei Diäthylanilin/Aminoantipyrin oxidiert wird. Die Absorption, die auf das Oxidationsprodukt zurückzuführen ist, ist direkt zur Cholesterinester-Reaktion proportional und wird durch 2 Filter (546nm und 600nm) mit der Endpunkt-Technik bestimmt und automatisch ausgedruckt. (19,22,29,31,32,72)

2.2.7 LDL-Cholesterin

1972 beschreiben Friedewald et al. (40) eine Möglichkeit zur Abschätzung des LDL-Cholesterins. Diese Methode erfordert die Messung von:

1. Gesamt-Cholesterin
2. Triglyzeriden
3. HDL-Cholesterin

Aus diesen Parametern läßt sich nach der sogenannten "Friedewald Formel"

$$\text{LDL-Chol} = \text{Gesamt-Chol} - \frac{\text{Triglyzeride}}{5} - \text{HDL-Chol}$$

das LDL-Chol abschätzen.
Friedewald geht dabei von folgenden Überlegungen aus:

1. Alle Triglyzeride sind in der VLDL-Fraktion enthalten, sofern keine Chylomikronen nachweisbar sind.
2. Der Cholesterinanteil der VLDL von ca. 20% ist relativ konstant.
3. Daraus resultiert die Gültigkeit der Formel bis zu einer Triglyzeridkonzentration von 400mg/dl.

Eine direkte Methode im Sinne einer Präzipitation stand mir zum Zeitpunkt der Versuche nicht zur Verfügung (97)

2.2.8 Lipoproteinelektrophorese

Qualitative und quantitative Bestimmung von Plasmalipoproteinen mit dem Elektrophorese-System RAPIDOPHOR (Immuno Diagnostika GmbH, Heidelberg).

Prinzip:
Die Lipoproteine werden in einem albuminhaltigen Agarmedium elektrophoretisch getrennt. Die anschließende Darstellung der Lipoproteinfraktionen erfolgt durch chemische Präzipitation mit Polyanionen. Dadurch werden die Lipoproteine deutlich sichtbar und vollständig ausgefällt. Eine Färbung entfällt somit. Mit modernen Präzisions-Densitometern (z.B. Liposcript, Firma Immuno, Heidelberg)

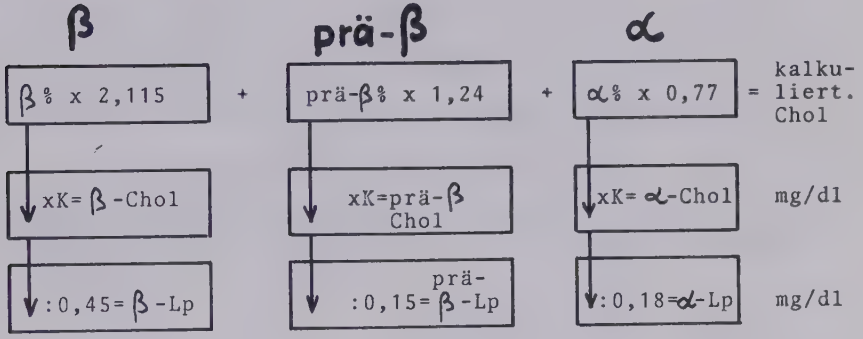
kann eine quantitative Auswertung der Lipoproteinbanden und Dokumentation der Befunde vorgenommen werden.
Reagentien: (Lipidophor all in 12, Immuno/Heidelberg)
1. Lipidophor Agarmediumträger
2. Lipidophor Agarmedium
3. Lipidophor Versiegelungsmedium
4. Lipidophor Kammerpuffer
5. Lipidophor Entwicklerlösung (1 und 2)
6. Lipidophor Gelschneider

Durchführung:
Nach Vorschrift des Herstellers (54)

Quantitative Auswertung nach Wieland und Seidel:
Für das Lipidophor all in 12 System gilt eine feste Beziehung zwischen densitometrisch ermitteltem Flächenintegral und entsprechenden Lipoproteinkonzentrationen (an 120 Normal- und hyperlipoproteinämischen Seren ermittelt). Diese Beziehung wurde bei der Standardisierung der Originalmethode mit hochgereinigten Lipoproteinen bestimmt, deren Konzentration gravimetrisch ermittelt worden war.
Die zur Berechnung der Serumkonzentrationen der drei Lipoproteinhauptfraktionen (α-Lp, prä-β-Lp, β-Lp) sowie des Cholesterinanteils der drei Lipoproteinfraktionen notwendigen Faktoren und die einzelnen Rechenschritte zeigt Tabelle 2.

Die Faktoren 2,115, 1,24 und 0,77 entstehen durch Multiplikation der prozentualen, konstanten Cholesterinanteile der einzelnen Lipoproteine (45 % für α-Lp, 15 % für prä-β-Lp und 18 % für β-Lp) mit den Faktoren f_{α}=4,7, $f_{\text{prä-}\beta}$= 8,29 und f_{β}=4,28 (Beziehung zwischen densitometrisch ermitteltem Flächenintegral und Lipoproteinkonzentration). Der Korrekturfaktor (K) ergibt sich durch Division des tatsächlich gemessenen Gesamtcholesterins durch das kalkulierte Gesamtcholesterin. (9,66,73,83,99)

Tab. 2
Berechnung zur Auswertung der quantitativen Lipoproteinelektrophorese mit Lipidophor all in 12 nach Wieland und Seidel. (98)



$$K = \frac{\text{Gesamt-Chol}}{\text{kalkuliertes Chol}}$$

2.3 ABKÜRZUNGEN

ACA	Automatic Clinical Analyzer
α- Lp	alpha-Lipoprotein
β- Lp	beta-Lipoprotein
prä-β- Lp	prä-beta-Lipoprotein
Apo A	Apolipoprotein A
Apo AI-Im	Apolipoprotein AI Immuno
Apo AII-Im	Apolipoprotein AII Immuno
Apo A-LN	Apolipoprotein A Laser Nephelometrie
Apo A-Ln-Fä	Apolipoprotein A LN im Überstand nach Fällung
Apo A-Pa	Apolipoprotein A M^R-Partigen
Apo B	Apolipoprotein B
Apo B-Im	Apolipoprotein B Immuno
Apo B-LN	Apolipoprotein B Laser Nephelometrie
Apo B-Pa	Apolipoprotein B M^R-Partigen
Chol	Cholesterin
Hb	Hämoglobin
HDL	high density lipoproteins
HDL-Chol	high density lipoprotein-Cholesterin
LDL	low density lipoproteins
LDL-Chol	low density lipoprotein-Cholesterin
VLDL	very low density lipoproteins
LSU	light scattering units
PEG	Poly-Ethylen-Glycol
RID	Radiale Immundiffusion

3. Ergebnisse

3.1 Qualitätskontrollen

3.1.1 Präzisionskontrollen

Als Präzisionskontrolle werden für die verschiedenen Bestimmungen Kontroll- bzw. Normalseren mitgeführt, zum Teil Seren, die niedere und hohe Konzentrationsbereiche abdecken. Dadurch erhalte ich Auskunft über die Streuung der Analysenergebnisse von Tag zu Tag bzw. Streuung in der Serie.

Dabei errechne ich

a) den arithmetischen Mittelwert $\bar{x}$:
als Summe aller Einzelwerte dividiert durch die Anzahl der Werte

$$x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} \bar{x}$$

b) die Varianz s^2:
durch die Division der Summe der Quadrate der Differenzen der Einzelwerte vom arithmetischen Mittelwert durch n minus 1

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

c) die Standardabweichung s:
durch die Wurzel aus der Varianz s^2

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

d) den Variationskoeffizienten (VK):
als Angabe der Standardabweichung in Prozent des Mittelwertes

$$VK = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

(47,77,78)

Ergebnisse:

Apo A (Behring-Laser-Nephelometer)

1) Kontrolle von Tag zu Tag:

a) Serum mit niederer Konzentration n=20
$\bar{x}$ = 124,6
s = 5,1
VK = 4,1%

b) Serum mit normaler Konzentration n=20
$\bar{x}$ = 214,2
s = 9,2
VK = 4,3%

2) Präzision in der Serie:

a) mit Präzipitation n=20
$\bar{x}$ = 227,4
s = 6,1
VK = 2,7%

b) ohne Präzipitation n=20
$\bar{x}$ = 232,0
s = 8,1
VK = 3,5%

Apo B (Behring-Laser-Nephelometer)

1) Kontrolle von Tag zu Tag:

a) Serum mit niederer Konzentration n=16
$\bar{x}$ = 52,9
s = 2,7
VK = 5,2%

b) Serum mit normaler Konzentration n=16
$\bar{x}$ = 104,4
s = 4,7
VK = 4,5%

2) Präzision in der Serie:

a) Serum mit niederer Konzentration n=13
$\bar{x}$ = 52,1
s = 1,2
VK = 2,3%

b) Serum mit normaler Konzentration n=30
$\bar{x}$ = 103,1
s = 2,2
VK = 2,1%

c) Serum mit hoher
Konzentration n=20
$\bar{x}$ = 195,8
s = 9,1
VK = 4,6%

Apo AI (immunoneph)
Kontrollen von Tag zu Tag:

a) Normcontrol (Immuno)
Lot-No. 063101 n=16
$\bar{x}$ = 76,8
s = 7,5
VK = 9,7%

b) Serum mit normaler
Konzentration n=16
$\bar{x}$ = 130,4
s = 11,4
VK = 8,8%

Apo AII (immunoneph)
Kontrollen von Tag zu Tag:

a) Normcontrol (Immuno)
Lot-No. 063101 n= 16
$\bar{x}$ = 25,6
s = 4,6
VK = 17,9%

b) Serum mit normaler
Konzentration n=16
$\bar{x}$ = 34,3
s = 3,9
VK = 11,3%

Apo B (immunoneph)
Kontrollen von Tag zu Tag:

a) Normcontrol (Immuno)
Lot-No. 063101 n=20
$\bar{x}$ = 57,6
s = 5,1
VK = 8,8%

b) Serum mit normaler
Konzentration n=20
$\bar{x}$ = 85,9
s = 8,3
VK = 9,6%

Apo A (M-Partigen^{R})
Kontrollen von Tag zu Tag:
Apo A-Standard (1:2) n=20
$\bar{x}$ = 101,3
s = 4,2
VK = 4,2%

Apo B (M-Partigen^{R})
Kontrollen von Tag zu Tag:
Kontrollogen Behring (1:2)
Lot-No. 047005D n=20

$\bar{x}$ = 53,4
s = 2,4
VK = 4,6%

HDL-Cholesterin
Kontrollen von Tag zu Tag:
Precilip (Boehringer)
Charge-Nr. 662 n=14

$\bar{x}$ = 38,4
s = 2,2
VK = 5,8%

Cholesterin
Autonorm TM (Merck)
batch Nr. 66 n=112
1.10.81-30.10.81

$\bar{x}$ = 176,8
s = 7,6
VK = 4,3%

Triglyzeride
Autonorm TM (Merck)
batch Nr. 66 n=117
1.10.81-30.10.81

$\bar{x}$ = 157,1
s = 5,4
VK = 3,4%

3.1.2 Richtigkeitskontrollen

Zur Erfassung systematischer Fehler dienen Richtigkeitskontrollen, die ich anhand verschiedener Richtigkeitsseren durchführe:

a) Precilip 662 (Boehringer) für HDL-Bestimmung
b) Normcontrol Apoproteins human (Immuno) Lot-No.063101 für Apo AI, Apo AII und Apo B
c) Kontrolplasma human für M-Partigen^{R}(Behring) Lot-No. 047005D für Apo A-Pa und Apo B-Pa sowie Apo B-LN
d) M+D Moni-Trol IE + IIE (Merz+Dade) Lot-No.164 und 64 für Cholesterin und Triglyzeride

In jedem Fall werden die Sollwerte erreicht.

3.2 Prüfung der Linearität durch Verdünnungsreihen

Da mit Hilfe von Test- bzw. Kontrollseren nur der Meßbereich dieser Seren auf seine Richtigkeit hin überprüft wird, ist es notwendig, eine Linearitätsprüfung über den gesamten Meßbereich durchzuführen. Als Verdünnungsmedium dient isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl). Mit diesem Verdünnungsmedium überprüfe ich die Linearität von Apo B-LN und Apo A-LN sowie Apo AI, Apo AII und Apo B Immuno an einem Humanserum, bei dem der erweiterte Lipidstatus im Bereich der Norm liegt.

Linearität für Apo A-LN und Apo B-LN (Behring)

Dabei verdünne ich das Serum stufenweise von 1:20 bis 1:640 für Apo A-LN und 1:20 bis 1:320 für Apo B-LN wie es auch für die Standardkurve üblich ist. Die gefundenen Meßwerte und die theoretischen Werte zeigt Tab. 3.

Serumverdünnung	Apo A-LN (mg/dl)		Apo B-LN (mg/dl)	
	theoretische Werte	Meßwerte	theoretische Werte	Meßwerte
0,05	980,8	960,4	542,4	490,4
0,025	490,4	475,9	271,2	273,6
0,0125	245,2	233,2	135,6	143,0
0,0062	122,6	137,7	67,8	70,7
0,003	61,3	73,5	33,9	33,0
0,0015	30,6	35,0		

Tab. 3 Serumverdünnung, theoretische Werte und Meßwerte bei der Linearitätsprüfung von Apo A-LN und Apo B-LN

Daraus errechne ich die Regressionsgeraden ($y=ax+b$) und die Korrelationskoeffizienten (r). (47,77)

Für Apo A-LN: $y = 18,9\ x + 9,44$ $\quad r = 0,999$

Für Apo B-LN: $y = 9,7\ x + 14,50$ $\quad r = 0,992$

Abb. 3 zeigt die graphische Darstellung der Linearität von Apo A-LN und Apo B-LN.

Man erkennt, daß sich sowohl für Apo A-LN über einen Meßbereich von 35-960mg/dl und auch für Apo B-LN über einen Bereich von 33-490mg/dl eine gute Linearität nachweisen läßt. Außerdem finden sich die Meßwerte in großer Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Lediglich bei einer Verdünnung von 1:20 erhalte ich für Apo B-LN etwas niedere Meßergebnisse.

Linearität von Apo AI, Apo AII und Apo B (Immuno)

Um auch hier den gesamten Meßbereich zu kontrollieren, werden die Serumproben wie die Firmenstandards in stufenweiser Verdünnung von 1:50 vis 1:400 vorbereitet. Die gefundenen Meßwerte und die theoretischen Werte demonstriert Tab. 4.

Serum-Verdünnung	Apo AI (mg/dl)		Apo AII (mg/dl)		Apo B (mg/dl)	
	theor. Werte	Meß-werte	theor. Werte	Meß-werte	theor. Werte	Meß-werte
0,02	204,0	204,0	88,6	82,6	116,4	123,8
0,015	154,5	158,8	66,4	61,9	87,3	90,4
0,01	102,0	108,0	44,3	37,4	58,2	53,1
0,005	51,0	55,1	22,2	18,5	29,1	25,9
0,0025	25,5	34,3	11,1	11,7	14,6	12,4

Tab. 4 Serumverdünnung, theoretische Werte und Meßwerte bei der Linearitätsprüfung von Apo AI, Apo AII und Apo B

Die errechneten Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizienten:

Für Apo AI : $y = 9,8\ x + 8,53$ $\quad r = 0,999$

Für Apo AII: $y = 4,4\ x - 2,79$ $\quad r = 0,995$

Für Apo B : $y = 6,4\ x - 6,21$ $\quad r = 0,998$

Abb. 4 zeigt die zeichnerische Darstellung der Linearität von Apo AI, Apo AII und Apo B (Immuno).

Auch hier erkennt man eine gute Linearität der drei gemessenen Apolipoproteine über einen Meßbereich von 34-204mg/dl für Apo AI, einen Meßbereich für Apo AII von 11-88mg/dl und von 12-124mg/dl für Apo B sowie eine gute Übereinstimmung der Meßwerte mit den theoretischen Werten.

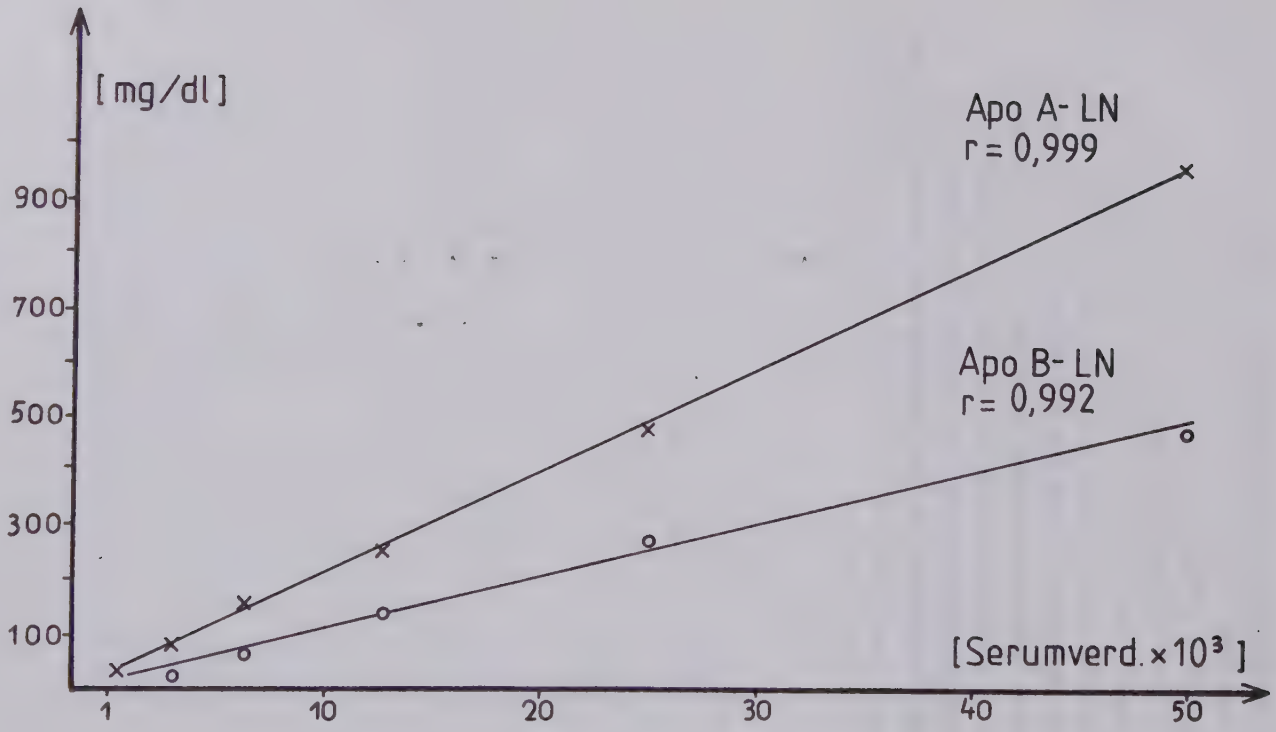


Abb. 3 Linearität von Apo A-LN und Apo B-LN (Behring)

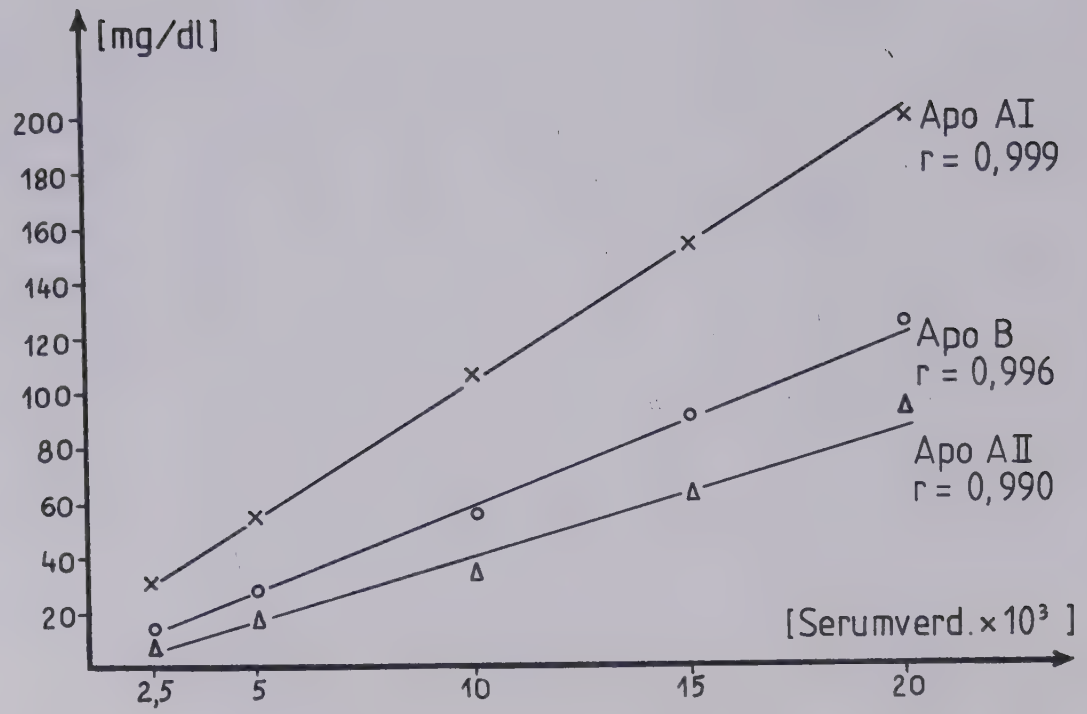


Abb. 4 Linearität von Apo AI, Apo AII und Apo B (Immuno)

3.3 Referenzwerte

Neben den von den Firmen angegebenen Referenzwerten werden auch eigene Referenzbereiche erstellt.
Diese gewinne ich aus einem "Normalkollektiv" (n=103, Chol 150-220mg/dl, TGL <175 mg/dl) wobei die Grenzen mit Hilfe von Verteilungskurven (Histogramme) anhand der 95% Perzentile gefunden werden. Tab. 5 zeigt einen Vergleich der Referenzbereiche und Mittelwerte zwischen Firmenangaben und eigenen Meßwerten. In Klammern die von der Firma 1983 modifizierten Referenzbereiche. (52)

Methode	Firmenangabe (mg/dl)		eigene Werte (mg/dl)	
	Referenz-bereich	Mittelwert	Referenz-bereich	Mittelwert
Apo A-LN	-	-	156-355	256
Apo A-LN-Fä	163-291	227	136-295	216
Apo B-LN	43-135	89	56-120	88
Apo A-Pa	150-300	225	136-315	226
Apo B-Pa	45-130	88	41-110	76
Apo AI-Im	110-130 (68-164)	120 (116)	76-170	123
Apo AII-Im	38-48 (13-42)	43 (28)	13- 50	32
Apo B-Im	bis 85 (59-122)	- (91)	46-120	83

Tab. 5 Referenzbereiche und Mittelwerte für die verschiedenen immunologischen Apo A- und Apo B-Bestimmungen

3.4 Einfluß von Hämoglobin und Bilirubin auf die immunologische Bestimmung der Apolipoproteine mit dem Behring-Laser-Nephelometer

Dabei untersuche ich Störeinflüsse durch Hämoglobin und Bilirubin, so wie sie in hämolytischen und ikterischen Seren vorkommen.

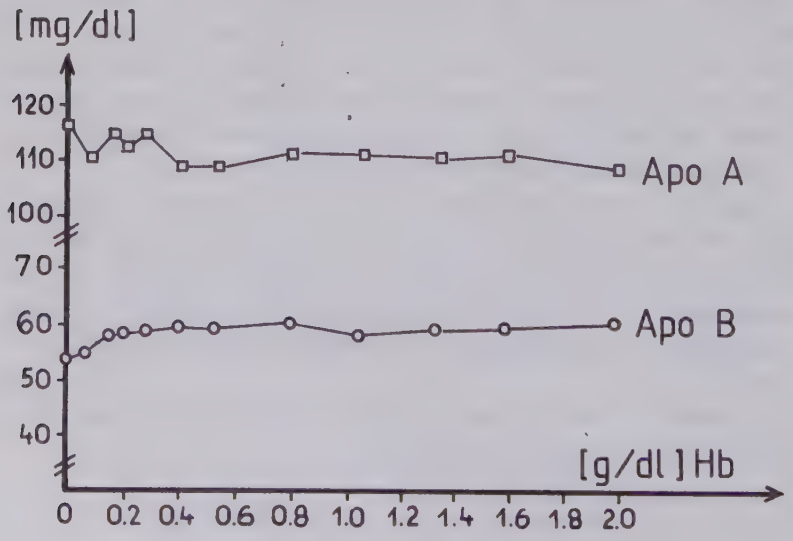
3.4.1 Hämoglobin

Den Störeinfluß des Hämoglobins prüfe ich an einem optisch klaren Pool-Serum (Hb <0,1g/dl) durch Zugabe steigender Mengen einer frisch hergestellten Hämoglobin-Lösung. So erreiche ich bei konstanten Lipoproteinkonzentrationen eine stufenweise Erhöhung der Hämoglobin-Konzentration. Die Hb-Lösung erhalte ich durch Hämolysieren einer Blutprobe, nachdem die Erythrozyten 5mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zwischendurch je 10 min in einer Zentrifuge bei 3500 U/min zentrifugiert waren. Zu den gewaschenen Erythrozyten gebe ich 2 Tropfen Hämolysin-Lösung (Lyse S, Firma Coulter electronics), die 0,03% Kaliumcyanid enthält. Dann wird das Hämolysat mit aqua bidest. aufgefüllt und 20 min bei 10 000 U/min in einer Sorval Superspeed RC-2 zentrifugiert, um die Erythrozytenzelltrümmer zu sedimentieren. Die so entstandene Hb-Lösung bestimme ich mit Hilfe eines Coulter-Counters und stelle sie auf eine Stammlösung von 4g/dl Hämoglobin ein. Anschließend werden die Serumansätze mit steigender Hb-Konzentration vorbereitet und die Apolipoproteine mit einem Behring-Laser-Nephelometer gemessen. Angaben über die in den verschiedenen Mischungsansätzen enthaltenen Bilirubinmengen und der aus 3 fach Bestimmung gefundenen Ergebnisse zeigt Tabelle 6.
Abb. 5 verdeutlicht zeichnerisch den Einfluß von Hämoglobin auf die immunologische Bestimmung.

Tab. 6 Angabe der Mischungsansätze der verschiedenen Hb-Konzentrationen und der Meßergebnisse für Apo A + Apo B

Nr.	Serum-menge (µl)	Hb-Lösung mit 4g/dl (µl)	NaCl 0,9% (µl)	=mg/dl Hb im Ansatz	Apo A (mg/dl)	Apo B (mg/dl)
1	150	-	150	-	117	54
2	150	5	145	66,6	111	55
3	150	10	140	133,3	115	53
4	150	15	135	200,0	113	58
5	150	20	130	266,6	114	59
6	150	30	120	400,0	108	60
7	150	40	110	533,3	108	60
8	150	60	90	800,0	111	60
9	150	80	70	1066,6	112	58
10	150	100	50	1333,3	111	60
11	150	120	30	1600,0	112	60
12	150	150	-	2000,0	108	61

Abb. 5 Einfluß von Hämoglobin auf die nephelometrische Bestimmung



Wie Abb. 5 zeigt, findet man eine meßfehlerbedingte Streuung sowohl der Apo A als auch der Apo B Meßwerte bis zu einer Hb-Konzentration von 2g/dl und somit keinen Störeinfluß durch Hämoglobin in den Proben.

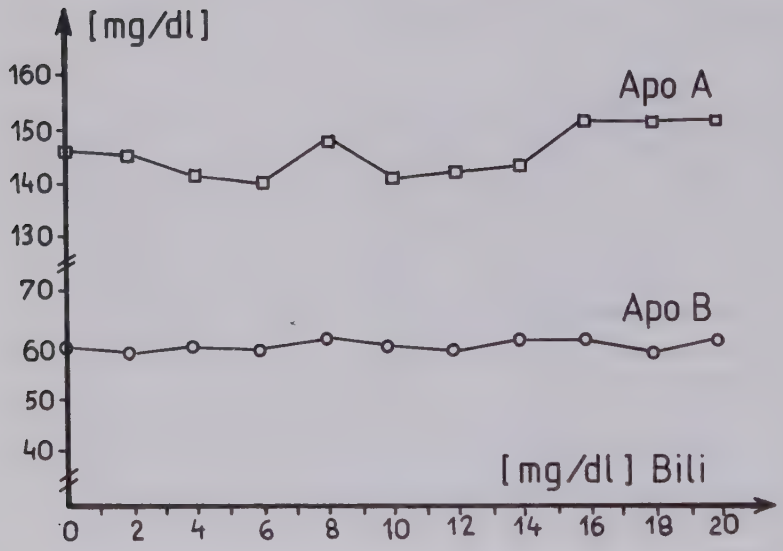
3.4.2 Bilirubin

Um den Einfluß bilirubinhaltiger Seren auf immunologische Apolipoproteinmessungen zu überprüfen, versetze ich ein gepooltes Humanserum mit einer Bilirubin-Lösung. Dazu löse ich ein lyophilisiertes Kontrollserum (Bili-control Fa. Dade Lot-No.-Bic-964) mit 1,5ml aqua bidest. auf und erhalte so einen Bilirubinstandard von 40mg/dl. Die Firmenangabe wird mit einem ACA überprüft. Danach erfolgt die Herstellung der Probenansätze mit stufenweise ansteigenden Bilirubinkonzentrationen und ebenfalls die Apolipoproteinmessungen (3-fach Werte). Dabei war der zuvor gemessene Apolipoproteingehalt des Bilirubinstandards alleine so gering, daß er unterhalb der Nachweisgrenze lag. Tab. 7 zeigt die erstellten Ansätze und Ergebnisse, Abb. 6 die zeichnerische Darstellung im Diagramm.

Nr.	Serum-menge (µl)	Bili-Stand 40mg/dl (µl)	NaCl 0,9% (µl)	≙Bili im Ansatz (mg/dl)	Apo A (mg/dl)	Apo B (mg/dl)
1	150	0	150	0	146	60
2	150	15	135	2	144	58
3	150	30	120	4	141	59
4	150	45	105	6	140	58
5	150	60	90	8	147	61
6	150	75	75	10	141	59
7	150	90	60	12	141	58
8	150	105	45	14	142	60
9	150	120	30	16	150	60
10	150	135	15	18	150	58
11	150	150	0	20	150	60

Tab. 7 Angabe der Mischungsansätze der verschiedenen Bili-Konzentrationen und der Ergebnisse für Apo A und Apo B

Abb. 6 Einfluß von Bilirubin auf die nephelometrische Bestimmung der Apo A und Apo B Konzentration



Man erkennt, daß bis zu einer Bilirubin-Konzentration von 20mg/dl die gefundenen Meßwerte für Apo A und Apo B keine Beeinflussung erkennen lassen und nur methodisch bedingte Streuungen vorliegen.

3.5 Untersuchungen zur Stabilität bzw. Haltbarkeit von Lipoproteinen

Die Stabilität der zu messenden Proben ist zur Beurteilung der Meßergebnisse von entscheidender Bedeutung.
Es ist kaum moglich, nur mit frischen Serumproben zu arbeiten, wenn eine große Anzahl von Probandenseren mit so vielen verschiedenen Methoden und Bestimmungen gleichzeitig untersucht werden soll.
Deshalb führe ich zuvor Untersuchungen über Haltbarkeit bei unterschiedlicher Aufbewahrungsart durch.

Aus frischen Nüchternseren mische ich drei Poolseren wobei Probe A einen Gesamtcholesterinwert > 300mg/dl enthält, Probe B <200mg/dl und Probe C 200-300mg/dl. Als Aufbewahrungsort wähle ich vier verschiedene Bereiche:

1. Raumtemperatur (20°C)
2. Kühlschranktemperatur (4°C)
3. Gefrierschrank (-20°C)
4. Gefriertruhe (-70°C)

Zur Prüfung bestimme ich folgende Laborparameter:

1. Gesamtcholesterin
2. Triglyzeride
3. HDL-Cholesterin (PWS/Mg^{2+}-Fällung)
4. LDL-Cholesterin (nach der Friedewald-Formel)
5. Apolipoprotein A
6. Apolipoprotein B

In den nächsten Abschnitten sollen Durchführung und Ergebnisse aufgezeigt und erläutert werden.

3.5.1 Raumtemperatur

Aus den bei Zimmertemperatur (20°C) aufbewahrten Poolseren bestimme ich täglich über 5 Tage drei-fach oben genannte Laborwerte; zusätzlich am 14. Tag und am 21. Tag.
Da sich bei allen drei Poolseren trotz unterschiedlich hoher Cholesterinkonzentration die Diagramme nahezu gleichen,

habe ich der Übersichtlichkeit wegen in Abb. 7 und 8 die auf 1 normierten Mittelwerte der Seren A,B,C dargestellt. Man erkennt an der Darstellung, daß Gesamtcholesterin und Triglyzeride über 3 Wochen stabil bleiben. HDL-Cholesterin zeigt am 21. Tag noch gute Stabilität. LDL-Cholesterin, nach der Friedewald-Formel berechnet, verdeutlicht einen fast identischen Verlauf wie das Gesamtcholesterin. Auffallendes Ergebnis ist die Abnahme von Apo A vom 5. Tag an. Am 21. Tag liegen die gefundenen Konzentrationen um 35% niederer als zu Beginn. Dagegen hält sich Apo B über 21 Tage stabil.

3.5.2 Kühlschranktemperatur

Dazu werden die Proben drei Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Auch hier bestimme ich täglich 5 Tage lang sowie am 14. und 21. Tag die in Kap. 3.5 genannten Fettstoffwechselparameter. Alle drei Poolseren zeigen untereinander nur Meßfehler bedingte Abweichungen und deshalb werden ebenso, der Einfachheit halber, die auf 1 normierten Mittelwerte der Proben A,B,C in Abb.9 und Abb.10 dargestellt.
Man erkennt, daß bei Aufbewahrung im Kühlschrank Gesamtcholesterin und Triglyzeride unverändert bleiben. Der scheinbare Anstieg zum 21. Tag ist nicht erklärbar. Wie schon bei Raumtemperatur fällt wiederum der nahezu identische Kurvenverlauf von LDL-Cholesterin und Gesamtcholesterin auf. HDL-Cholesterin zeigt sich genau wie Apo B über 3 Wochen stabil. Beim Apo A findet sich eine Haltbarkeit bis zum 14. Tag. Danach fällt die Apo A-Konzentration bis zum 21. Tag um 13% auf 87% des Ausgangswertes ab. Dies liegt bei einem VK von ca 4% am Rande des -3s Bereichs.

3.5.3 Einfrieren der Serumproben bei -20°C und -70°C

Dabei sollen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren eine Aussage über die Stabilität gewonnen werden.

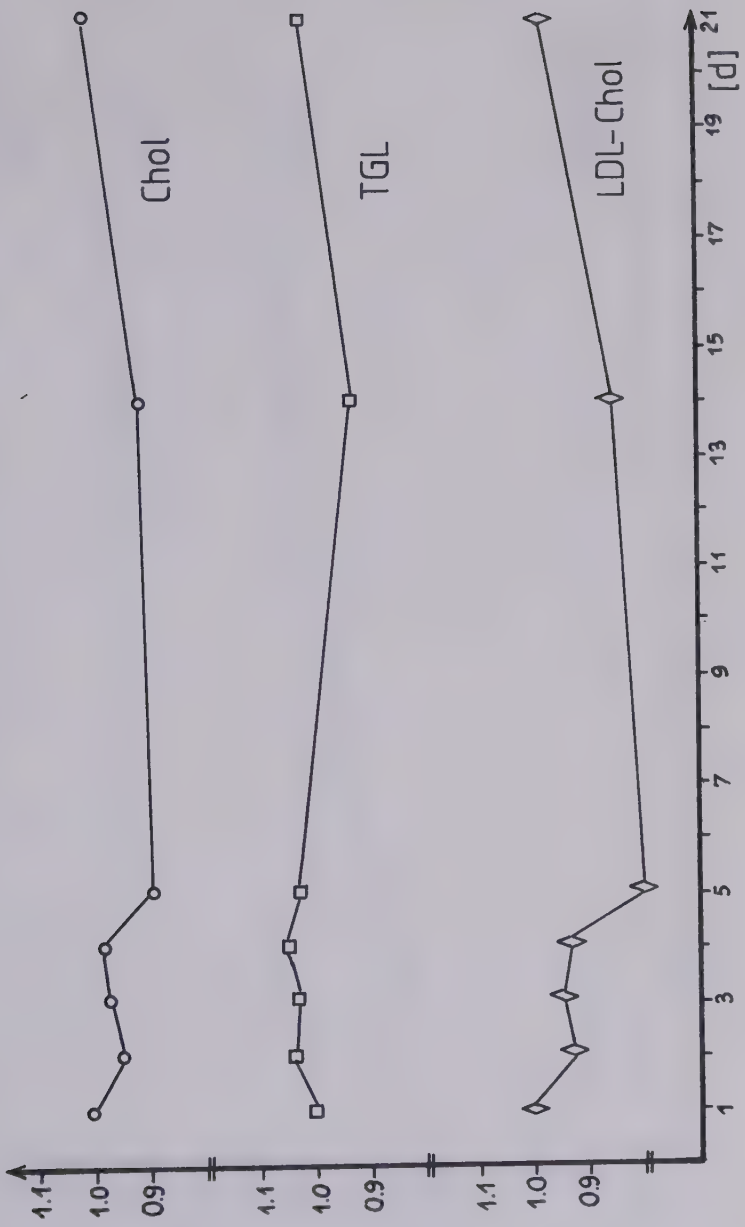


Abb. 7 Stabilität von Cholesterin, Triglyzeriden und LDL-Chol über 21 Tage bei Raumtemperatur

Abb. 8 Stabilität von HDL-Chol, Apo A und Apo B über 21 Tage bei Raumtemperatur

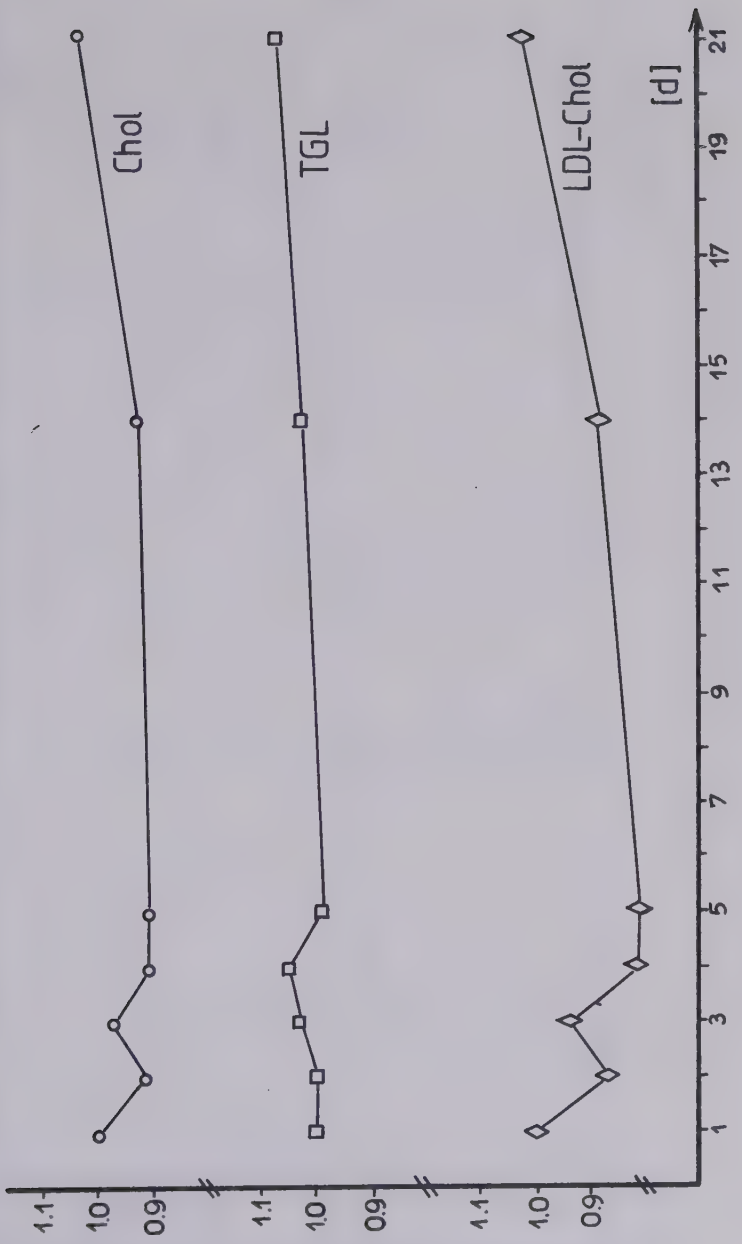


Abb. 9 Stabilität von Cholesterin, Triglyzeriden und LDL-Chol über 21 Tage bei 4°C

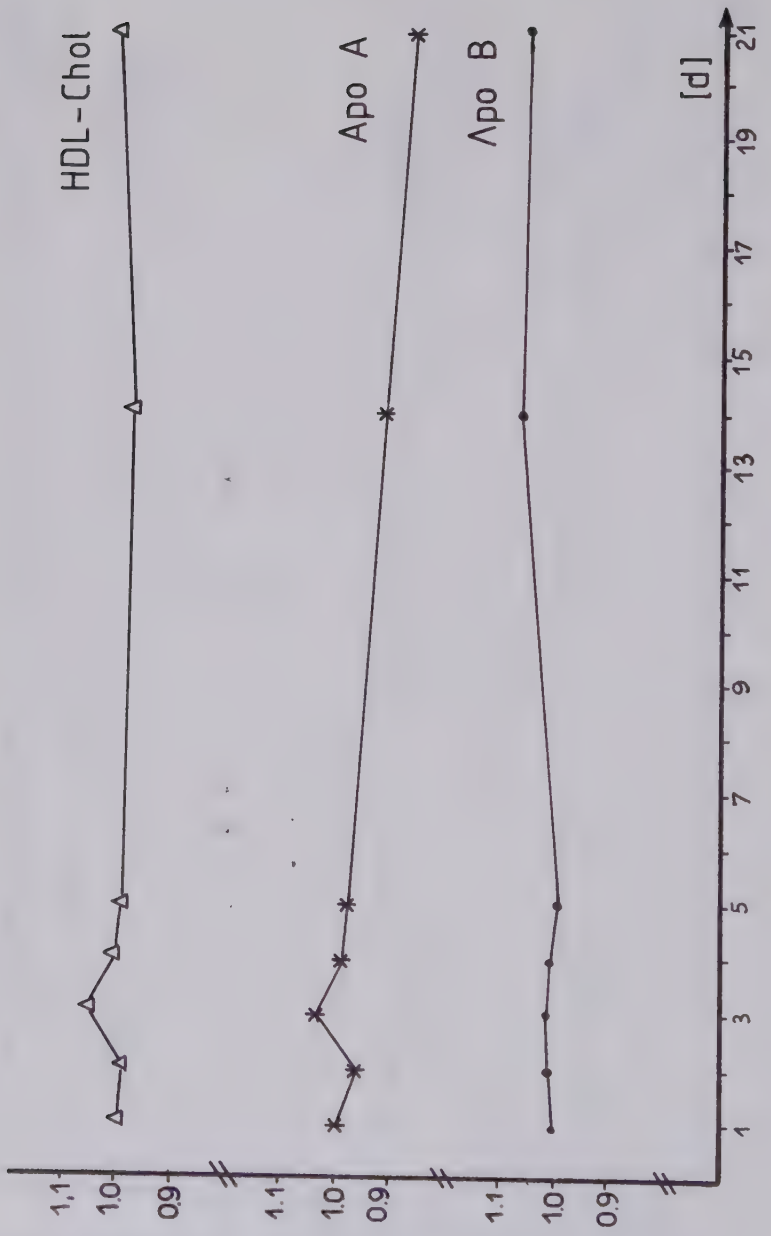
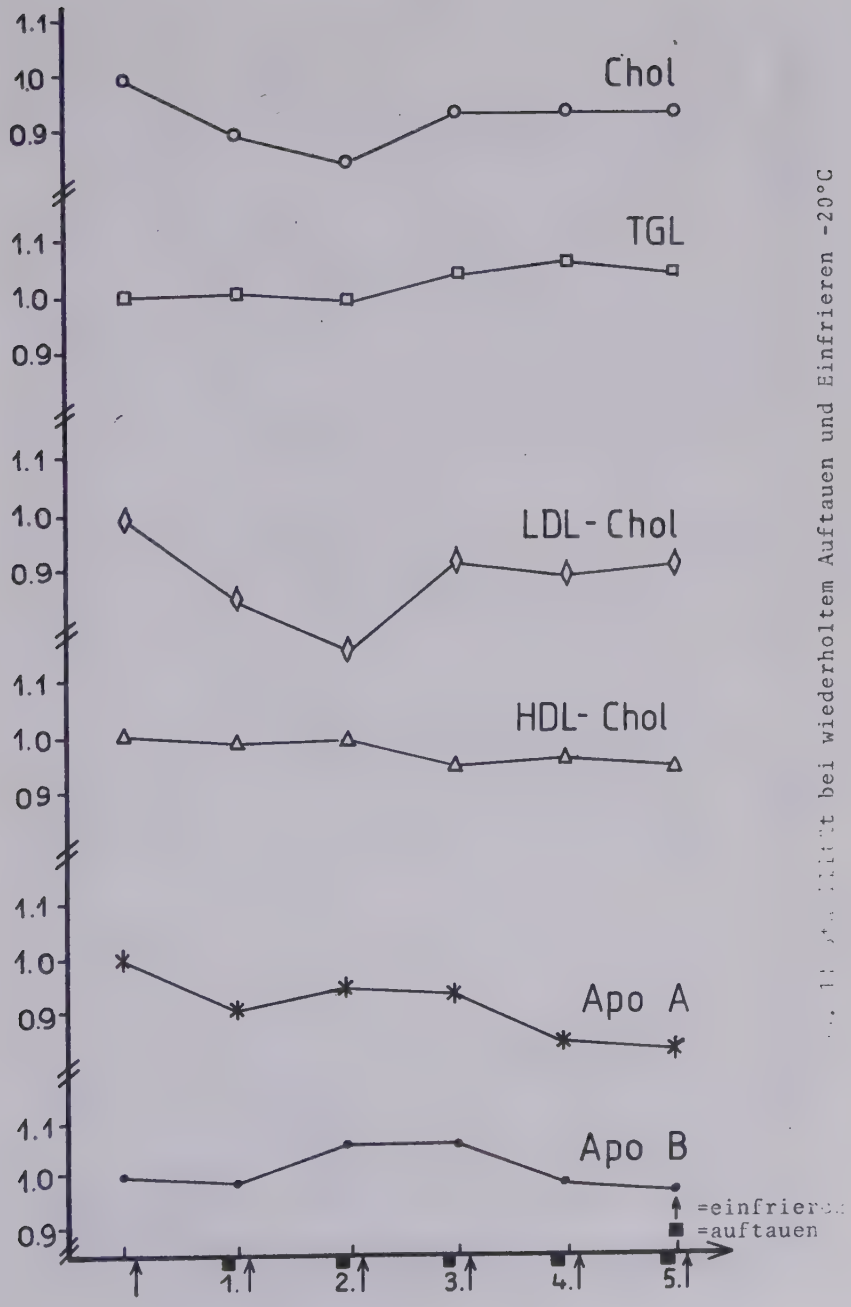


Abb. 10 Stabilität von HDL-Chol, Apo A und Apo B über 21 Tage bei 4°C



...t bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren -20°C

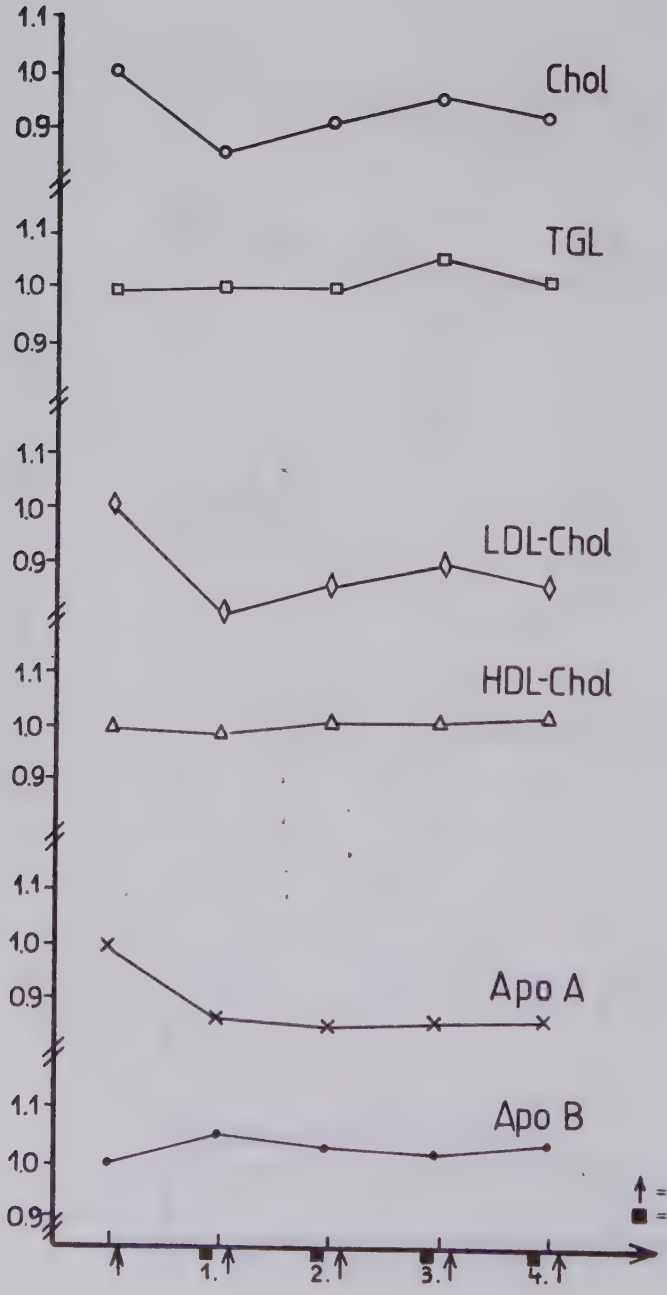


Abb. 12 Stabilität bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren -70°C

Dazu bestimme ich in drei frischen, gepoolten Nüchternseren mit verschieden hohen Gesamtcholesterinwerten die oben genannten 6 Laborparameter (drei-fach) und friere die Proben in verschlossenen Eppendorf Reaktionsgefäßen ein. Vom 2. bis 5. oder 6. Tag werden die gleichen Proben aufgetaut und immer wieder Chol, TGL, HDL-Chol, LDL-Chol, Apo A und Apo B gemessen. Abb. 11 und Abb. 12 demonstrieren zeichnerisch die auf 1 normierten Ergebnisse.
Wie Abb. 11 zeigt, findet sich eine gute Stabilität der gemessenen Fettstoffwechselparameter Cholesterin, Triglyzeride, HDL-Cholesterin und Apo B nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen bei -20°C. Die Abweichungen liegen innerhalb der Meßfehlergrenzen. Die immunologische Bestimmung der Apo A-Konzentrationen fällt nach dem 4.Auftauvorgang um 16% ab. Die optisch starke Abweichung von LDL-Chol entsteht durch die Berechnung nach Friedewald. Schon bei geringem Cholesterin-Abfall z.B. ergeben sich deutlich größere LDL-Chol-Schwankungen. Außerdem schlägt dabei die absolute Cholesterin-Konzentration zu Buche. Auch in Abb. 12 bei -70°C Einfriertemperatur bleiben Cholesterin, TGL, HDL-Chol und Apo B stabil. Allerdings verdeutlicht die Zeichnung auch hier eine um ca 14% niederer liegende Apo A-Konzentration schon beim ersten Auftauen. Anschließende Messungen ergeben keinen weiteren Abfall. LDL-Chol verhält sich genau wie bei -20°C.

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Haltbarkeitsprüfung

1. Es sollen möglichst frische Seren in der erweiterten Lipoproteindiagnostik zur Bestimmung gelangen.
2. Ungeeignet ist die Aufbewahrung bei Raumtemperatur, da sich vor allem für Apo A schon früh falsch niedere Konzentrationen ergeben.
3. Bei 4°C im Kühlschrank bleiben die Proben 2 Wochen stabil, dann fällt auch hier Apo A zuerst ab.

4. Einfrieren von Serumproben bei -20°C ist durchaus möglich, es sollte aber beim Arbeiten mit immunologischen Methoden ein häufiges Auftauen vermieden werden.
5. Das Einfrieren bei -70°C zeigt gegenüber -20°C keine Vorteile.

3.6. Methodenvergleich mit Hilfe des t-Tests

Im Rahmen des Methodenvergleichs wird getestet, ob die Mittelwerte $\bar{x}$ und $\bar{y}$ zweier Grundgesamtheiten gleich oder verschieden sind. Dazu benütze ich den Student-t-Test für unterschiedliche Varianzen, nachdem ich Mittelwerte und Standardabweichungen der Stichproben berechnet habe. (77)

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\frac{s_x^2}{n_1} + \frac{s_y^2}{n_2}}$$

Unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und der Anzahl der Freiheitsgrade wird die Signifikanzgrenze für t aus einer Tabelle abgelesen. (28)

3.6.1 Vergleich der verschiedenen Methoden: Gesamtkollektiv

a) Apolipoprotein A-Bestimmungen:
Vergleicht man Apo A-LN mit Apo A-LN-Fä und Apo A-Pa, finde ich mit t=5,7 und t=5,9 für Apo A-LN signifikant höhere Ergebnisse.
Apo A-LN-Fä zeigt gegen Apo A-Pa keinen Signifikanzunterschied.
Apo AI-Im liegt erwartungsgemäß deutlich niederer.
b) Apolipoprotein B-Bestimmungen:
Im Vergleich von Apo B-LN mit Apo B-Pa und Apo B-Im findet man für Apo B-LN mit t=2,7 und t=5,2 signifikant höhere Meßwerte. Außerdem unterscheidet sich Apo B-Pa mit deutlich höheren Ergebnissen bei einem t von 2,2 von Apo B-Im. (Apo B-LN> Apo B-Pa> Apo B-Im)

3.6.2 Vergleich der verschiedenen Klientelgruppen mit dem t-Test

a)Vergleicht man das Sportkollektiv (Gr. 2) mit dem Normalkollektiv (Gr. 1) so ergeben sich für die Sportler:

Methode	t	Niveau
Chol	6,67	*
TGL	1,55	n.s.
Apo A-LN	7,70	*
Apo A-LN-Fä	8,30	*
Apo B-LN	9,98	*
Apo B-Im	7,07	*
Apo AI-Im	7,45	*
Apo AII-Im	5,10	*
Apo A-Pa	3,90	*
Apo B-Pa	10,30	*

* = signifikant erhöht
** = signifikant erniedrigt
n.s. = nicht signifikant

In allen Bestimmungen haben Sporler signifikant höhere Meßwerte im Mittelwertvergleich; Ausnahme TGL.

b)Unterschiede der Ergebnisse des Normalkollektivs im Vergleich mit der "Grauzone" (Gr. 7). Dabei finde ich für die Gruppe mit Chol 220-300mg/dl folgende Signifikanzen:

Methode	t	Niveau
Chol	5,17	*
TGL	6,62	*
Apo A-LN	2,69	*
Apo A-LN-Fä	3,90	*
Apo B-LN	6,10	*
Apo B-Im	2,14	*
Apo AI-Im	1,56	n.s.
Apo AII-Im	0,70	n.s.
Apo A-Pa	1,92	*
Apo B-Pa	15,85	*

Die Gruppe "Grauzone" zeigt signifikant höhere Mittelwerte mit Ausnahme von Apo AI-Im und Apo AII-Im.

c)Vergleich des Normalkollektivs mit der Gruppe 6
(Chol > 300mg/dl, TGL > 175mg/dl

Methode	t	Niveau
Chol	17,35	*
TGL	7,66	*
Apo A-LN	3,10	*
Apo A-LN-Fä	3,50	*
Apo B-LN	20,80	*
Apo B-Im	13,90	*
Apo AI-Im	2,39	*
Apo AII-Im	2,90	*
Apo A-Pa	1,66	*
Apo B-Pa	11,50	*

* = signifikant erhöht
** = signifikant erniedrigt
n.s. = nicht signifikant

Alle Methoden haben bei der Gruppe der "Hohen" signifikant höhere Mittelwerte im Vergleich zum Normalkollektiv.

d)Hierbei wird das Normalkollektiv mit der Gruppe 4
(Chol <220mg/dl, TGL > 175mg/dl) verglichen.

Methode	t	Niveau
Chol	1,28	n.s.
TGL	11,30	*
Apo A-LN	0,43	n.s.
Apo A-LN-Fä	0,38	n.s.
Apo B-LN	9,50	*
Apo B-Im	3,40	*
Apo AI-Im	2,30	**
Apo AII-Im	0,01	n.s.
Apo A-Pa	1,70	*
Apo B-Pa	8,90	*

Ich finde für Gr. 4 signifikant hohere Mittelwerte bei allen 3 Apolipoprotein B Bestimmungen. Die Apo A Bestimmungen verhalten sich unterschiedlich. Während die Lasernephelometriemethoden nicht signifikant abweichen berechnet man für Apo AI-Im niederere Werte und für Apo A-Pa höhere Ergebnisse. Apo AII-Im liegt gleich.

e)Vergleich der Gruppen 5 (Chol> 300mg/dl, TGL < 175mg/dl) und 7 (Chol> 300mg/dl, TGL> 175mg/dl).

Methode	t	Niveau
Chol	1,47	n.s.
TGL	7,60	*
Apo A-LN	0,90	n.s.
Apo A-LN-Fä	0,10	n.s.
Apo B-LN	1,69	n.s.
Apo B-Im	0,70	n.s.
Apo AI-Im	0,33	n.s.
Apo AII-Im	0,40	n.s.
Apo A-Pa	0.80	n.s.
Apo B-Pa	0,01	n.s.

n.s. = nicht signifikant

* = signifikant erhöht

Für keine der durchgeführten Apolipoprotein-Bestimmung zeigt sich eine signifikante Abweichung im Mittelwertvergleich mit dem t - Test.

3.7 Methodenvergleich (Korrelationen)

Um eine weitere Aussage über die verschiedenen Methoden machen zu können, wird jede Bestimmung mit allen anderen korreliert. Dabei berechne ich den Korrelationskoeffizienten (r) und die lineare Regressionsgeraden ($y=ax+b$). Die folgenden Tabellen zeigen die gefundenen Korrelationskoeffizienten (r) einmal des Gesamtkollektivs und zum anderen der einzelnen Patientengruppen (Gruppen 1-7), um Unterschiede, Gemeinsamkeiten und Trends besser herausarbeiten zu können.
Ein $r \geq 0{,}8$ wird mit **o** hervorgehoben. Der Übersicht halber wird auf die Geradengleichung verzichtet.

3.7.1 Korrelationskoeffizienten des Gesamtkollektivs

Tab. 8 Korrelationskoeffizienten für das Gesamtkollektiv mit n=305

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
0,37	0,46	0,49	o 0,83	o 0,80	0,42	0,41	0,33	0,74	Chol
	0,12	0,10	0,42	0,35	0,02	0,10	0,08	0,39	TGL
		o 0,92	0,28	0,29	0,76	0,63	o 0,81	0,18	Apo A LN
			0,30	0,33	o 0,81	0,64	o 0,85	0,21	Apo A LN-Fä
				o 0,87	0,24	0,25	0,17	o 0,86	Apo B LN
					0,38	0,34	0,16	0,72	Apo B Im
						0,62	0,68	0,13	Apo A I-Im
							0,53	0,15	Apo A II-Im
								0,14	Apo A Pa

Man erkennt für das Gesamtkollektiv:

a) Gute Korrelation der Nephelometriemethoden Apo B-LN und Apo B-Im mit Cholesterin; aber nur mäßige für Apo B-Pa mit Cholesterin.

b) Gute Übereinstimmung von Apo B-LN mit Apo B-Pa und Apo B-Im, wobei Apo B-Pa mit Apo B-Im nur mit r-0,72 korreliert.

c) Gute Korrelation von Apo A-LN gegenüber Apo A-LN-Fä und und Apo A-Pa, mäßige zu Apo AI-Im. Dabei zeigt Apo A-LN im Überstand die bessere Übereinstimmung mit Apo A-Pa und Apo AI-Im. Am wenigsten korreliert Apo A-Pa mit Apo AI-Im (0,68).

3.7.2 Korrelationskoeffizienten für die Gruppen 1-7

Es folgen jetzt die Korrelationskoeffizienten (r) im Rahmen des Methodenvergleichs für die Gruppen 1-7 in Tab. 9 bis Tab. 15.

Tab. 9 Korrelationskoeffizienten der Gruppe 1 mit n=103 (Normalkollektiv, Chol <220mg/dl, TGL <175mg/dl)

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
0,07	0,25	0,24	0,42	0,20	0,29	0,15	0,31	0,43	Chol
	-0,09	-0,15	0,36	0,15	-0,12	-0,26	-0,22	0,20	TGL
		° 0,94	-0,18	-0,18	0,58	0,42	° 0,81	-0,11	Apo A LN
			-0,25	-0,23	0,59	0,47	0,83	-0,16	Apo A LN-Fä
				0,64	-0,08	-0,17	-0,14	0,74	Apo B LN
					0,21	-0,08	-0,13	0,58	Apo B Im
						0,23	0,51	0,04	Apo A I-Im
							0,47	-0.11	Apo A II-Im
								-0,07	Apo A Pa

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	α Chol	prä-β Chol	β Chol	
0,37	0,49	0,41	0,60	0,67	0,30	0,17	0,37	0,58	0,23	0,10	0,90	Chol
	0,19	0,17	0,29	0,13	-0,11	-0,01	0,02	0,17	-0,20	0,50	0,37	TGL
		0,75	0,49	0,43	0,54	0,44	0,63	0,47	0,40	0,16	0,31	Apo A LN
			0,30	0,30	0,68	0,38	0,73	0,34	0,46	0,10	0,21	Apo A LN-Fä
				0,78	0,26	0,08	0,21	0,74	-0,02	0,18	0,60	Apo B LN
					0,36	0,18	0,24	0,78	-0,02	0,09	0,70	Apo B Im
						0,51	0,54	0,36	0,50	-0,10	0,14	Apo A I-Im
							0,31	0,17	0,24	0,07	0,08	Apo A II-Im
								0,31	0,40	0,04	0,19	Apo A Pa
									0,11	0,20	0,54	Apo B Pa
										-0,14	-0,14	α Chol
											-0,02	prä-β Chol

Tab. 10 Korrelationskoeffizienten der Gruppe 2 (Sportler)

Tab. 11 Korrelationskoeffizienten von Gruppe 3 mit n=20
(Chol <150mg/dl, TGL <150mg/dl)

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
-0,12	0,59	0,63	0,62	0,62	0,58	0,58	0,58	0,66	Chol
	-0,11	-0,14	0,30	0,39	-0,12	-0,34	-0,11	0,19	TGL
		°0,98	0,20	0,22	°0,84	0,66	°0,90	0,17	Apo A LN
			0,19	0,20	°0,87	0,70	°0,93	0,16	Apo A LN-Fä
				°0,83	0,15	0,03	0,17	°0,86	Apo B LN
					0,14	0,13	0,26	°0,87	Apo B Im
						0,72	°0,82	0,11	Apo A I-Im
							0,73	0,14	Apo A II-Im
								0,18	Apo A Pa

Tab. 12 Korrelationskoeffizienten von Gruppe 4 mit n=20
(Chol < 220mg/dl, TGL> 200mg/dl)

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
0,46	0,53	0,49	0,51	0,34	0,32	0,32	0,51	0,37	Chol
	0,39	0,41	0,10	-0,09	0,27	0,26	0,37	-0,10	TGL
		°0,96	-0,22	-0,23	0,76	°0,87	°0,89	-0,32	Apo A LN
			-0,26	-0,24	°0,83	°0,82	°0,92	-0,30	Apo A LN-Fä
				0,72	-0,24	-0,22	-0,06	0,69	Apo B LN
					0,03	-0,06	-0,16	0,48	Apo B Im
						0,74	0,78	-0,38	Apo A I-Im
							0,72	-0,37	Apo A II-Im
								-0,14	Apo A Pa

Zu Tab. 9

Für das Referenzkollektiv finde ich:

a) Schlechte Korrelationen von Apo B-LN, Apo B-Im und Apo B-Pa mit Cholesterin.
b) Mäßige Übereinstimmung der drei verschiedenen Apolipoprotein B-Bestimmungen untereinander,
c) gute Korrelation von Apo A-LN-Fä, Apo A-LN und Apo A-Pa untereinander,
d) unzureichende Übereinstimmung von Apo AI-Im mit den anderen Apolipoprotein-Bestimmungen.

Zu Tab. 10

Hier wird zusätzlich das Ergebnis der Lipoproteinelektrophorese berücksichtigt.

Das Sportkollektiv (Gr. 2) zeigt (n=71):

a) Gute Übereinstimmung von β-Chol mit Cholesterin,
b) mäßige Korrelation der verschiedenen Apo B-Bestimmungen untereinander und im Vergleich dieser drei mit β-Chol,
c) mäßige bis schlechte Übereinstimmung der Apo A-Methoden untereinander und schlechte Korrelationen der immunologischen Bestimmungen mit α-Cholesterin.

Zu Tab. 11

Für Gruppe 3 mit niederen Chol- und TGL-Werten demonstriert die Tabelle (n=20):

a) Sehr gute Übereinstimmung aller Apo A-Bestimmungen,
b) gute Korrelationen der drei Apolipoprotein B-Methoden.

Zu Tab. 12

Für Gruppe 4 (Chol $<$ 220mg/dl, TGL $>$ 200mg/dl) mit n=20 finde ich:

a) Gute Korrelationen aller Apolipoprotein A-Methoden, einschließlich Apo AII-Im,
b) mäßige Übereinstimmung der drei Apo B-Bestimmungen.

Tab. 13 Korrelationskoeffizienten der Gruppe 5 mit n=20 (Chol > 300mg/dl, TGL < 175mg/dl)

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
0,18	-0,09	-0,15	0,67	0,65	0,02	-0,27	-0,21	0,40	Chol
	-0,03	-0,11	0,21	0,21	0,07	-0,01	0,21	0,45	TGL
		0,92°	-0,42	-0,48	0,78	0,77	0,84°	-0,29	Apo A LN
			-0,62	-0,58	0,86°	0,88°	0,80°	-0,41	Apo A LN-Fä
				0,84°	-0,47	-0,70	-0,45	0,74	Apo B LN
					-0,32	-0,64	-0,56	0,52	Apo B Im
						0,79	0,65	-0,27	Apo A I-Im
							0,73	-0,46	Apo A II-Im
								-0,05	Apo A Pa

Tab. 14 Korrelationskoeffizienten der Gruppe 6 mit n=20 (Chol > 300mg/dl, TGL > 175mg/dl)

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
-0,26	-0,01	0,04	0,55	0,65	0,21	0,21	-0,05	0,47	Chol
	0,34	0,01	0,19	0,10	-0,07	0,34	-0,16	-0,47	TGL
		0,86°	-0,23	-0,16	0,68	0,58	0,72	-0,34	Apo A LN
			-0,16	-0,08	0,87	0,52	0,94°	-0,33	Apo A LN-Fä
				0,35	-0,15	-0,19	-0,09	0,44	Apo B LN
					0,04	0,14	-0,15	0,30	Apo B Im
						0,52	0,78	-0,32	Apo A I-Im
							0,38	-0,38	Apo A II-Im
								-0,20	Apo A Pa

Tab. 15 Korrelationskoeffizienten der Gr. 7, "Grauzone" mit n=51 (Chol 220-300mg/dl, TGL normal bis erhöht)

TGL	Apo A LN	Apo A LN-Fä	Apo B LN	Apo B Im	Apo A I-Im	Apo A II-Im	Apo A Pa	Apo B Pa	
-0,25	0,07	-0,02	0,46	0,22	0,04	0,10	-0,01	0,49	Chol
	0,02	-0,03	0,25	0,35	-0,02	-0,08	-0,04	0,09	TGL
		0,93°	-0,37	-0,17	0,73	0,57	0,80°	-0,28	Apo A LN
			-0,38	0,65	0,53	0,60	0,80°	-0,30	Apo A LN-Fä
				0,55	0,22	-0,22	-0,33	0,71	Apo B LN
					0,09	0,17	-0,28	0,25	Apo B Im
						0,60	0,57	-0,23	Apo A I-Im
							0,40	-0,06	Apo A II-Im
								-0,27	Apo A Pa

Zu Tab. 13

Die Tabelle zeigt die Korrelationskoeffizienten der Gr. 5. Dabei finde ich:

a) Gute Korrelationen der verschiedenen Apo A-Methoden untereinander,

b) gute Übereinstimmung von Apo B-LN mit Apo B-Im und nur mäßige dieser beiden mit Apo B-Pa.

Zu Tab. 14

Die Tabelle veranschaulicht im Rahmen des Methodenvergleichs für Gruppe 6:

a) Schlechte Übereinstimmung der unterschiedlichen Apo B-Methoden,

b) gute Korrelationen der Apo A-Bestimmungen.

Zu Tab. 15

Für die Gruppe "Grauzone" läßt sich folendes erkennen:

a) Gute Übereinstimmung der Ergebnisse Apo A-LN, Apo A-LN-Fä und Apo A-Pa, jedoch nur mäßige dieser 3 mit Apo AI-Im.
b) Mäßige Korrelationen von Apo B-LN mit Apo B-Im und Apo B-Pa, aber schlechte Vergleichbarkeit von Apo B-Pa mit Apo B-Im.

3.7.3 Zusammenfassung:
Ergebnisse-Methodenvergleich-Korrelationen

a) Während im Gesamtkollektiv Apo B-LN und Apo B-Im gut mit Chol korreliert und für Apo B-Pa eine mäßige Übereinstimmung gefunden wird, liegen in den einzelnen Gruppen die Korrelationskoeffizienten der 3 Apo B-Methoden im Vergleich zu Chol nur zwischen 0,2 und 0,67.
b) Beim Vergleich der 3 Apo B-Bestimmungen untereinander finde ich gute Korrelationen im Gesamtkollektiv.
In den verschiedenen Klientelgruppen sind die Ergebnisse unterschiedlich. Mit steigenden TGL-Werten (Gr.4+6) fällt eine Abnahme der Vergleichbarkeit auf. Alle anderen Gruppen zeigen mäßige bis gute Übereinstimmung.
c) Korreliert man die 4 immunologischen Apo A-Methoden miteinander, imponiert bei Apo A-LN, Apo A-LN-Fä und Apo A-Pa eine ausgezeichnete Vergleichbarkeit. Allerdings zeigt Apo AI-Im nur mäßige Übereinstimmung mit den 3 anderen Methoden, wobei die schlechtesten Korrelationskoeffizienten beim Vergleich Apo AI-Im mit Apo A-Pa auffallen.
d) Der Versuch Apo AII-Im mit den anderen Methoden zu vergleichen, bringt nur unbefriedigende Ergebnisse.
e) Auffallend ist ein Trend der negativen Korrelation beim Vergleich der TGL mit Apo A Lipoproteinen. Dies gilt nur für die Gruppen mit TGL <175mg/dl.
f) Eine Sonderstellung nimmt Gr.2 (Sportler) ein. Hier habe ich die Möglichkeit immunologische Methoden mit Ergebnissen der Lipoproteinelektrophorese zu vergleichen.
Ich finde gute Übereinstimmung von β-Chol mit Chol ($r=0,9$), mäßige Vergleichbarkeit der immunologischen Apo B-Methoden mit β-Chol und schlechte Korrelationen der Apo A-Bestimmungen mit α-Chol.

3.8 Vergleich der Gruppen mit Histogrammen

In diesem Abschnitt soll versucht werden, mit den bestimmten Apolipoproteinen eine Zuordnung zu gewissen Risikogruppen bzw. eine Unterscheidung der Gruppen vorzunehmen. Verglichen werden die Gruppen:

a) Kollektive mit hohem Chol (> 300mg/dl) mit dem Referenzkollektiv,
b) die "Grauzone" (Chol 220-300mg/dl) mit dem Referenzkollektiv,
c) Sportler mit dem Referenzkollektiv.

Dazu dienen Histogramme, wobei die Häufigkeit als Funktion der Apolipoproteinkonzentration aufgetragen wird.

3.8.1 Histogramme für Apo B-LN

Abb. 13 bis 15 zeigen die graphische Darstellung für Apo B-LN. Dabei sind im oberen Teil die Kollektive hohes Chol, "Grauzone" bzw. Sportler und im unteren Teil das Referenzkollektiv gezeichnet. Die Klassen breite beträgt 10mg/dl.

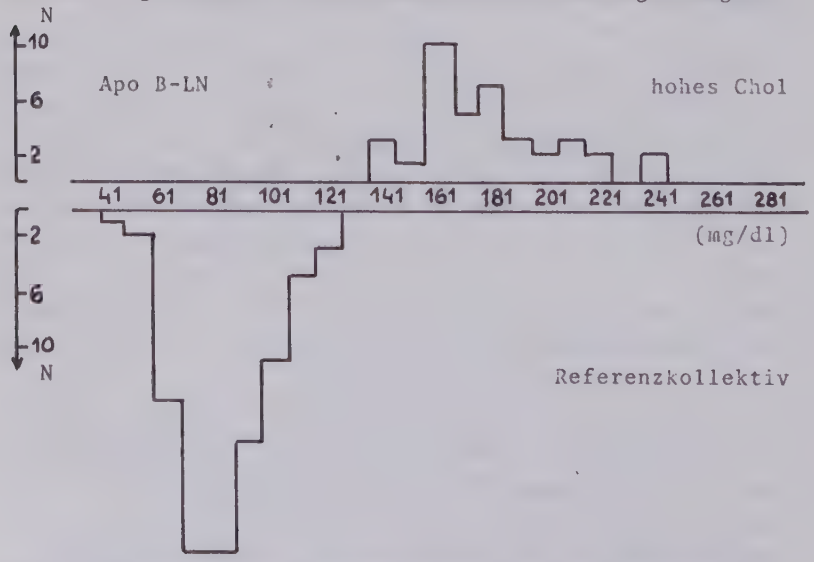


Abb. 13 Vergleich der Gruppen hohes Chol mit Referenzkollektiv für Apo B-LN mit Histogrammen

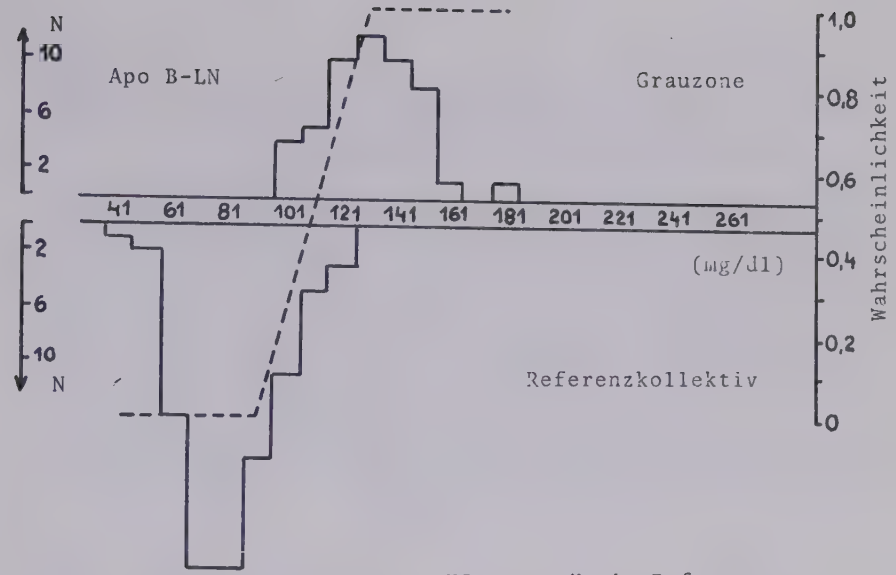


Abb. 14 Vergleich der Gruppen "Grauzone" mit Referenzkollektiv für Apo B-LN mit Histogrammen

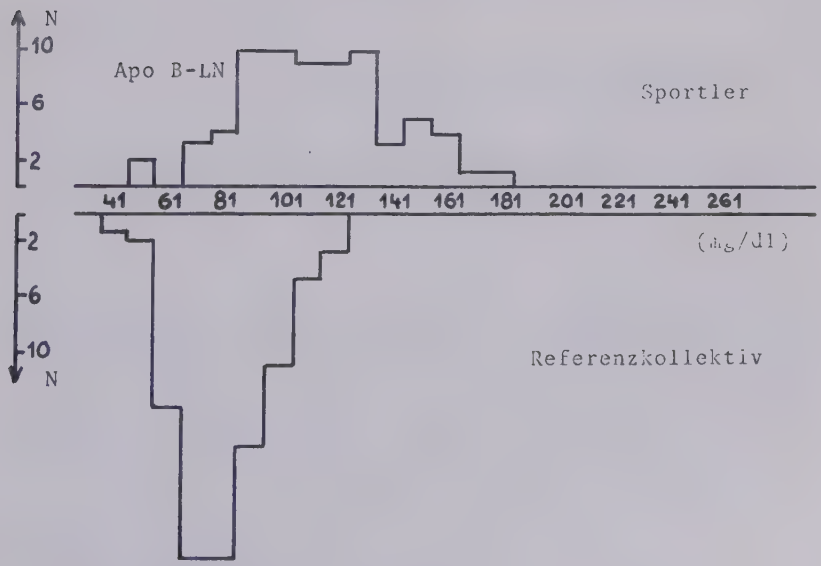


Abb. 15 Vergleich der Gruppen Sportler und Referenzkollektiv für Apo B-LN mit Histogrammen

Zu Abb. 13
Wie es schon für Cholesterin > 300mg/dl gilt, ist es auch mit Apo B-LN möglich, eindeutig zur Gruppe "hohes Risiko" zuzuordnen, wenn Apo B-LN >130mg/dl gefunden wird.

Zu Abb. 14
Beim Vergleich "Grauzone" mit Referenzkollektiv finde ich für Apo B-LN einen deutlichen Überlappungsbereich von 101-130mg/dl. Deshalb wird zusätzlich eine Wahrscheinlichkeitskurve (----) eingezeichnet. Sie zeigt bei meinen Kollektiven in den Klassen 101-130mg/dl mit 0,26, 0,50 und 0,76 eine zunehmende Wahrscheinlichkeit zur Gruppe "hohes Risiko" zu gehören und bestätigt mit Apo B-LN ≥130mg/dl die eindeutige Zuordnung.

Zu Abb. 15
Bei den sich überlappenden Histogrammen ist es mit Apo B-LN nicht möglich, eine Aussage für Sportler zu machen. Insgesamt haben Sportler geringgradig höhere Apo B-LN Ergebnisse.

3.8.2 Histogramme für Apo B-Pa

Identische Ergebnisse finde ich für die Methode Apo B-Pa. Deshalb wird auf eine Darstellung verzichtet.

3.8.3 Histogramme für Apo B-Im

Gleiches Vorgehen für Apo B-Im wie bei Apo B-LN. Auch hier werden im oberen Teil die Kollektive "hohes Chol", "Grauzone" und Sportler und im unteren Teil das Referenzkollektiv graphisch dargestellt. Die Klassenbreite beträgt auch hier 10mg/dl. Abb. 16 bis Abb. 18.

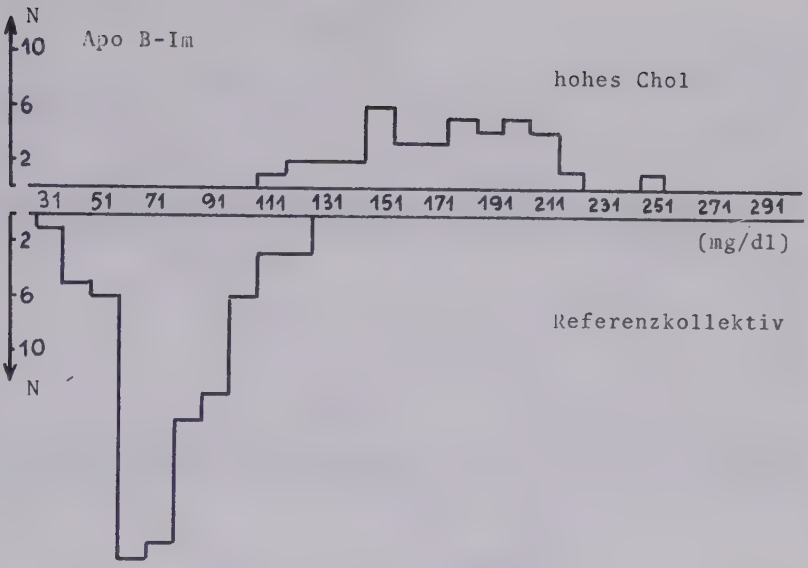


Abb. 16 Vergleich der Gruppen hohes Chol mit Referenzkollektiv für Apo B-Im mit Histogrammen

Zu Abb. 16
Außer in einem Überlappungsbereich von 111-130mg/dl bestätigt auch Apo B-Im eine mögliche Zuordnung zum "hohen Risiko" mit Apo B-Im> 130mg/dl bzw. eine Zuordnung zum Referenzkollektiv bei Apo B-Im <110mg/dl, wie es schon anhand der gemessenen Cholesterinwerte getan wurde.

Zu Abb. 17
Hier überdecken sich die Histogramme derart, daß zwischen "Grauzone" und Referenzkollektiv mit Apo B-Im nicht mehr unterschieden werden kann. Dies im Gegensatz zu Apo B-LN.

Zu Abb. 18
Mit Apo B-Im finde ich geringgradig höhere Ergebnisse beim Sportkollektiv. Es ist jedoch nicht möglich, eine Aussage für die Sportler zu machen.

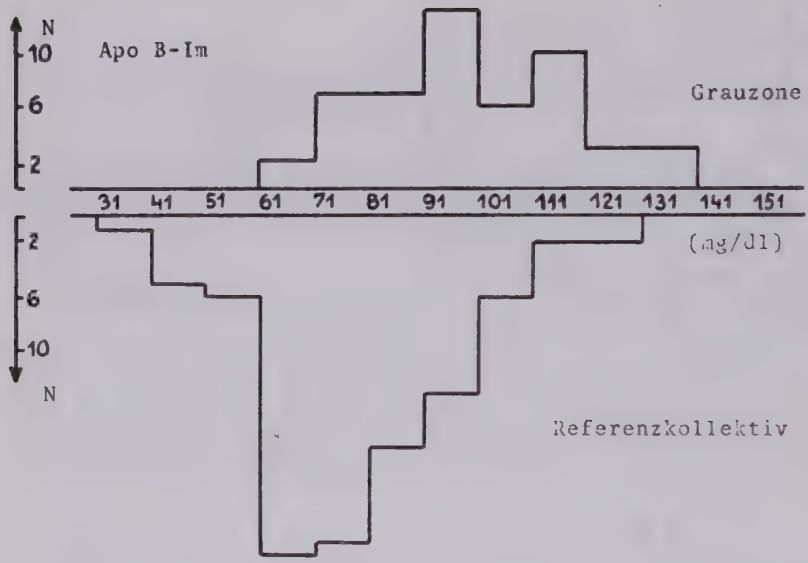


Abb. 17 Vergleich der Gruppen "Grauzone" und Referenzkollektiv für Apo B-Im mit Histogrammen

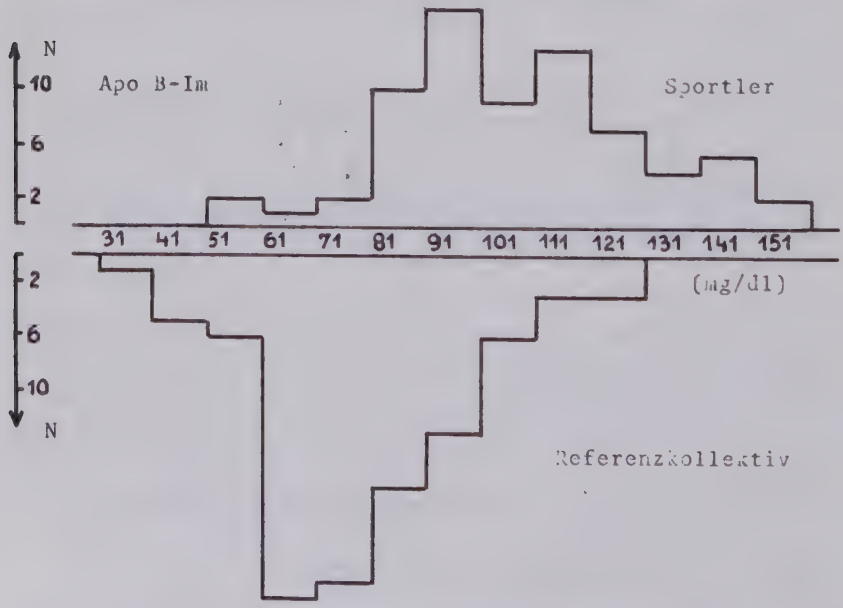


Abb. 18 Vergleich der Gruppen Sportler und Referenzkollektiv für Apo B-Im mit Histogrammen

3.8.4 Histogramme für Apo A-LN-Fä

Jetzt folgt in gleicher Weise für Apo A-LN-Fä die Darstellung mit Histogrammen der Gruppen "hohes Cholesterin", "Grauzone" und Sportler im Vergleich zum Referenzkollektiv. Graphische Darstellung in den Abbildungen 19 bis 21. Die Klassenbreite beträgt jetzt 20mg/dl.

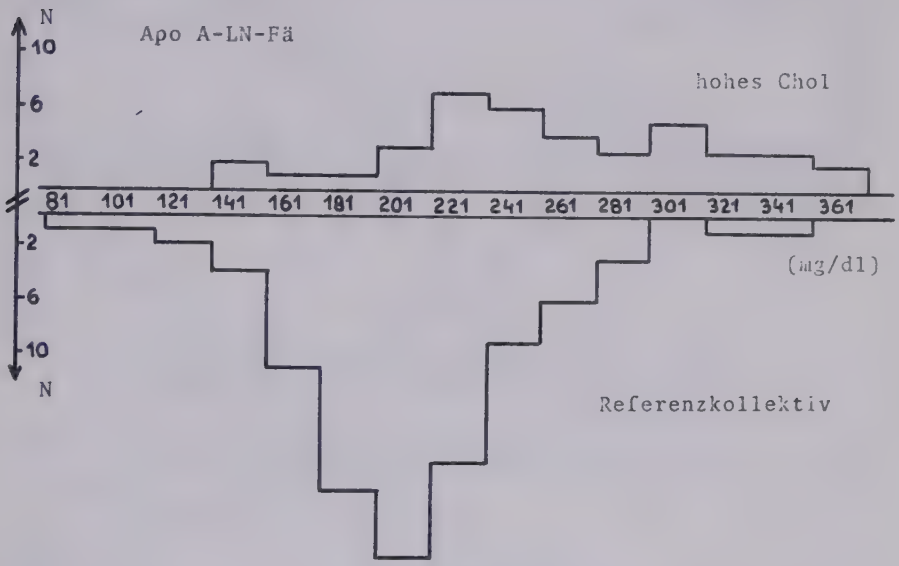


Abb. 19 Vergleich der Gruppen hohes Chol mit Referenzkollektiv für Apo A-LN-Fä mit Histogrammen

Zu Abb. 19 bis 21
Die Zeichnungen demonstrieren, daß es alleine mit den gefundenen Apo A-LN-Fä Parametern nicht möglich ist, bei den sich fast vollständig überlappenden Histogrammen eine Zuordnung zu einem Kollektiv zu finden. Das Sportkollektiv zeigt andeutungsweise höhere Apo A-LN-Fä Konzentrationen. Für Apo A-Pa erhalte ich identische Ergebnisse.

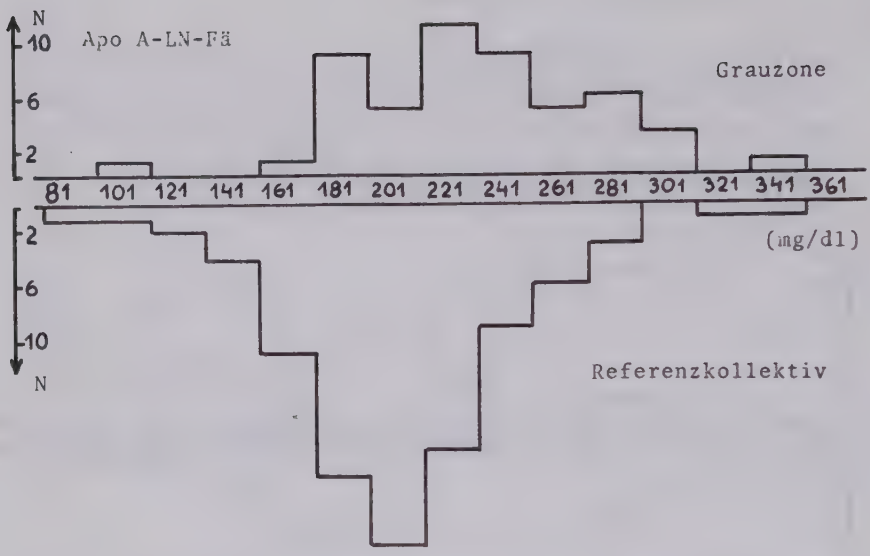


Abb. 20 Vergleich der Gruppen "Grauzone" und Referenzkollektiv für Apo A-LN-Fä mit Histogrammen

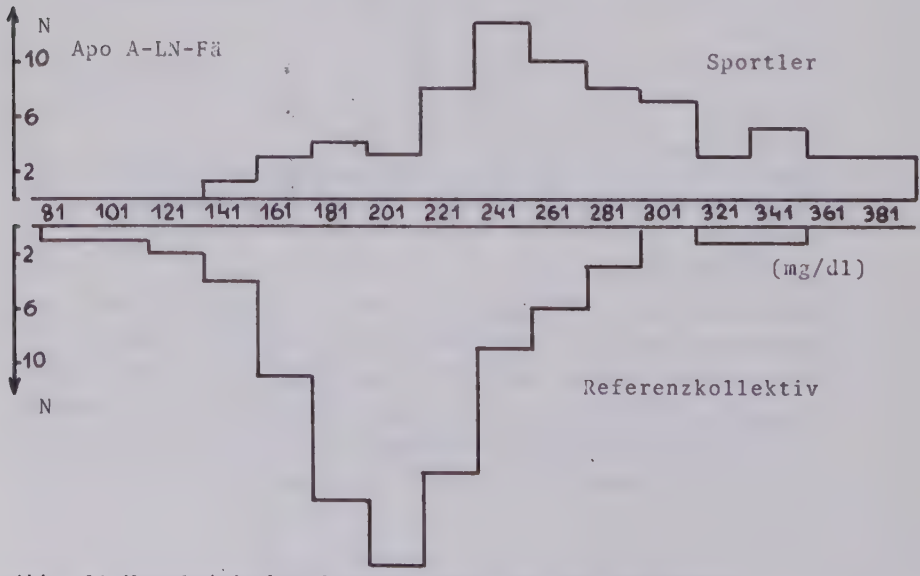


Abb. 21 Vergleich der Gruppen Sportler und Referenzkollektiv für Apo A-LN-Fä mit Histogrammen

3.8.5 Histogramme für Apo AI-Im

Auch hier erfolgt eine gleichartige Darstellung mit Hilfe von Histogrammen für Apo AI-Im in Abb. 22 bis Abb. 24. Die Klassenbreite beträgt 10mg/dl.

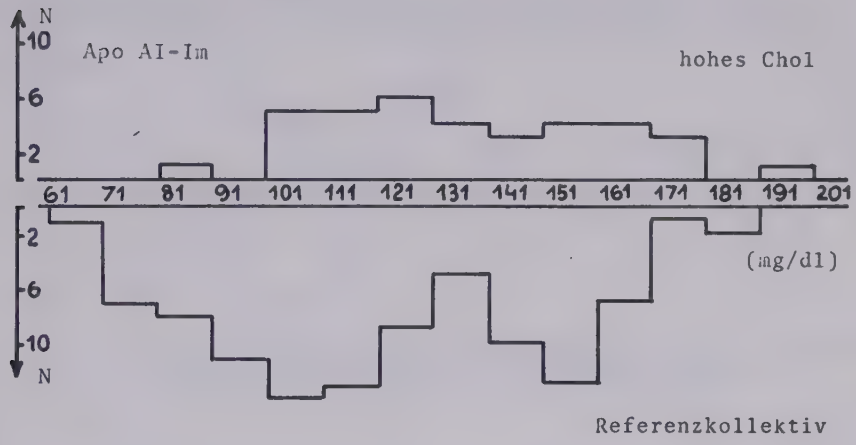


Abb. 22 Vergleich der Gruppen hohes Chol mit Referenzkollektiv für Apo AI-Im mit Histogrammen

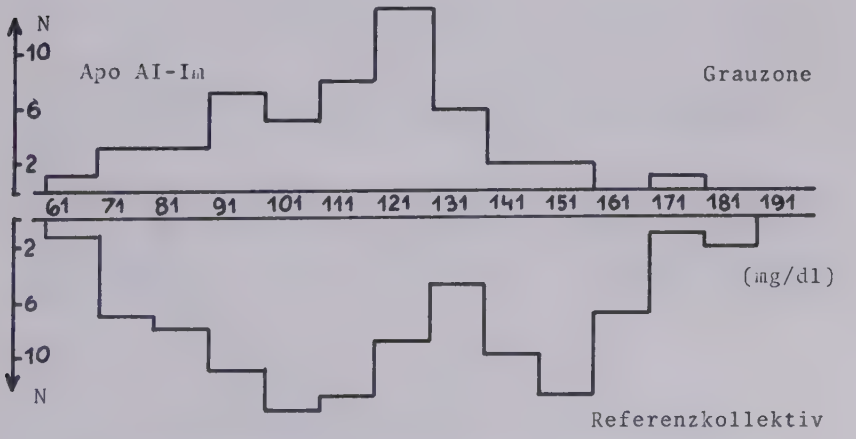


Abb. 23 Vergleich der Gruppen "Grauzone" und Referenzkollektiv für Apo AI-Im mit Histogrammen

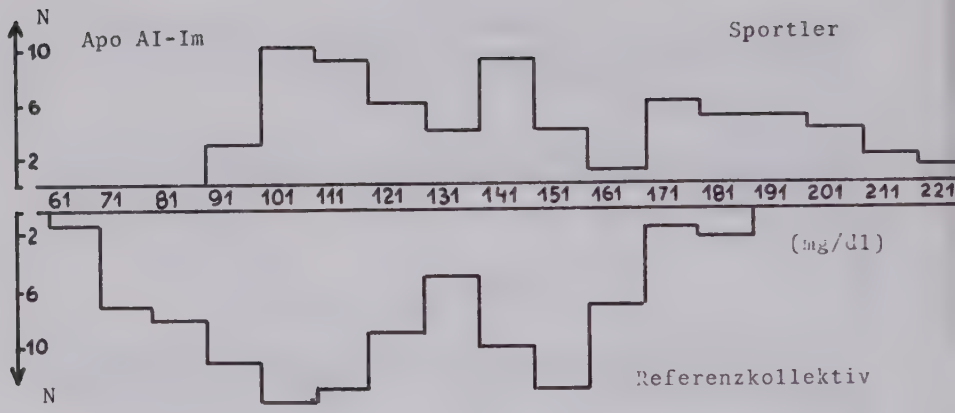


Abb. 24 Vergleich der Gruppen Sportler und Referenzkollektiv für Apo AI-Im mit Histogrammen

Zu Abb. 22 bis 24
Wie auch bei Apo A-LN-Fä ist es mit Apo AI-Im unmöglich, eine differenzierte Aussage im Rahmen der Gruppeneinteilung vorzunehmen. Die Histogramme überlappen sich fast vollständig. Lediglich beim Sportkollektiv ist der Trend zu höheren Apo AI-Im Werten zu erkennen.

3.8.6 Histogramme für Apo AII-Im

Abschließend ein Vergleich der selben Gruppen anhand von Histogrammen wie zuvor für Apo AII-Im. Abb. 25 bis 27 zeigt die Ergebnisse. Die Klassenbreite wird mit 5mg/dl dargestellt.

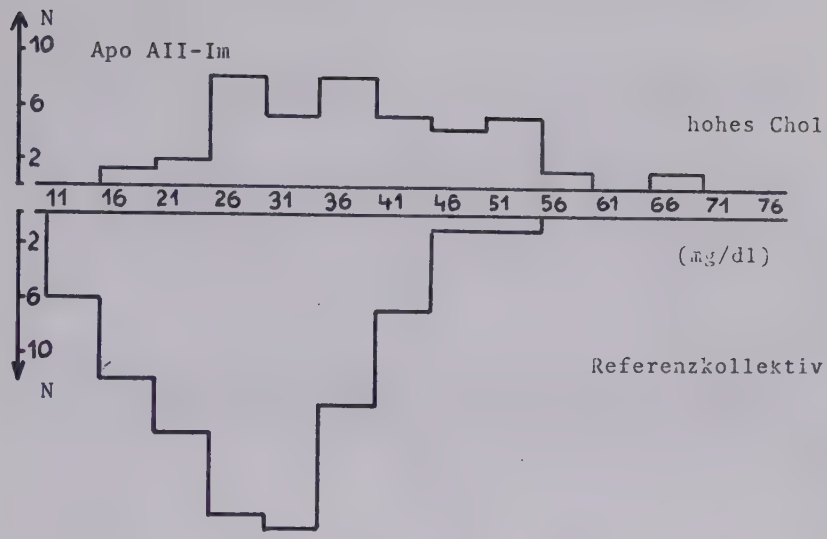


Abb. 25 Vergleich der Gruppen hohes Chol mit Referenzkollektiv für Apo AII-Im mit Histogrammen

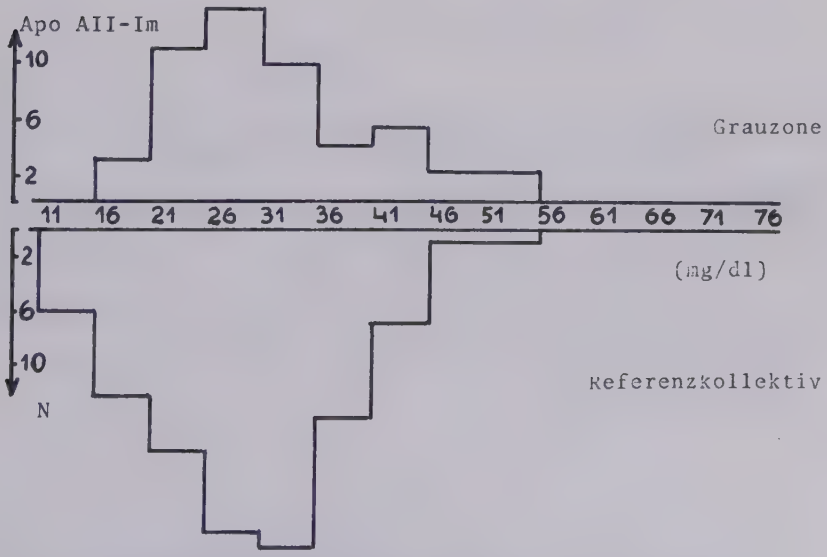


Abb. 26 Vergleich der Gruppen "Grauzone" und Referenzkollektiv für Apo AII-Im mit Histogrammen

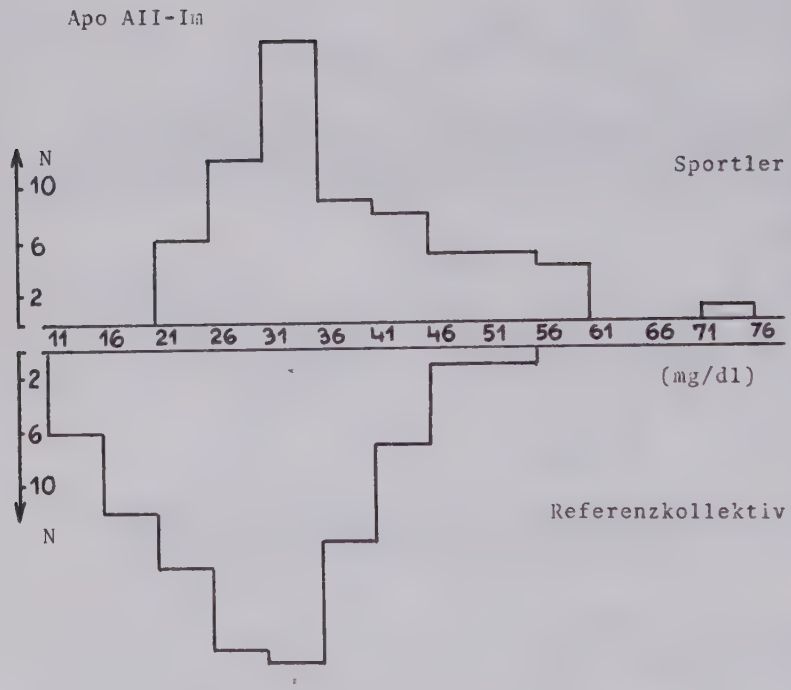


Abb. 27 Vergleich der Gruppen Sportler und Referenzkollektiv für Apo AII-Im mit Histogrammen

Zu Abb. 25 bis 27

Wie die Zeichnungen verdeutlichen, kann Apo AII-Im nicht zur Differenzierung herangezogen werden, da sich die Histogramme vollständig überdecken. Lediglich das Sportkollektiv fällt mit vereinzelt höheren Apo AII-Im Konzentrationen auf.

3.9 Vergleich der Gruppen mit Darstellung der Quotienten Apo B/Apo A

In diesem Kapitel werden erneut die Klientele "hohes Chol", "Grauzone", Sportler und Referenzkollektiv verglichen, jetzt nach Berechnung der Quotienten Apo B/Apo A. Dieses Verhältnis soll bei einer Beurteilung der Fettstoffwechsellage in prognostischer Hinsicht sogar einen höheren prädiktiven Wert als der LDL/HDL-Quotient haben. (67)

Die Darstellung der Quotienten erfolgt in Form von Histogrammen, wobei die Häufigkeiten als Funktion des Verhältnisses Apo B/Apo A aufgetragen sind. Die Klassenbreite beträgt 0,1. Im oberen Teil erscheinen die Gruppen "hohes Chol", "Grauzone" und Sportler, im unteren Teil das Referenzkollektiv.
Abb. 28 bis 30: Quotienten für Apo B-LN/Apo A-LN-Fä
Abb. 31 bis 33: Quotienten für Apo B-Im/Apo AI-Im

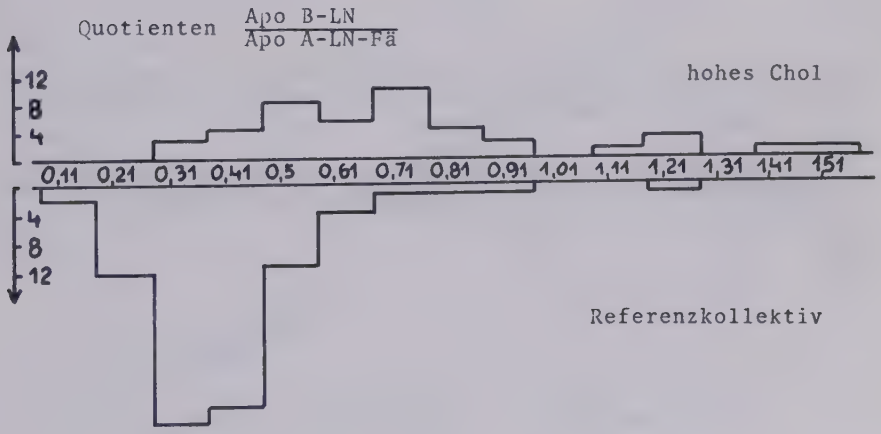


Abb. 28 Vergleich der Gruppen "hohes Chol" mit dem Referenzkollektiv nach Berechnung der Apo B-LN/Apo A-LN-Fä-Quotienten

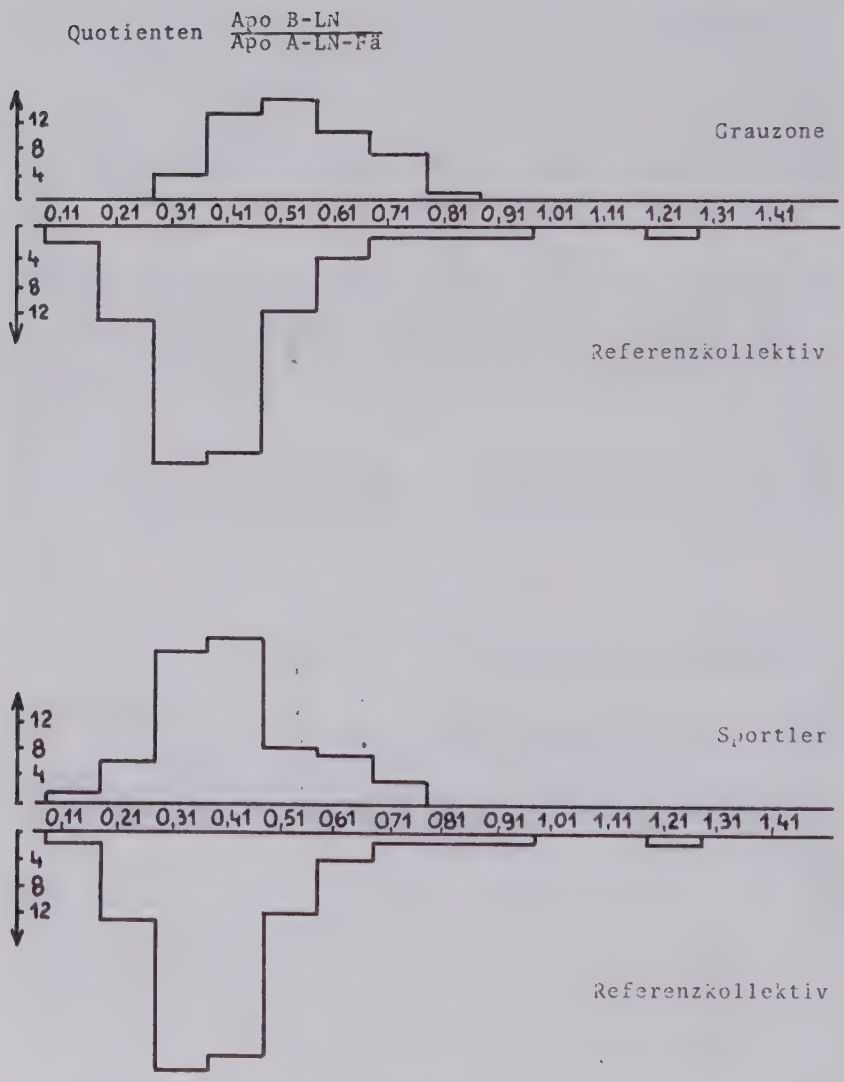


Abb. 29 und Abb. 30 Vergleich der Gruppen "Grauzone" und Sportler mit dem Referenzkollektiv anhand der Apo B-LN/Apo A-LN-Fä-Quotienten

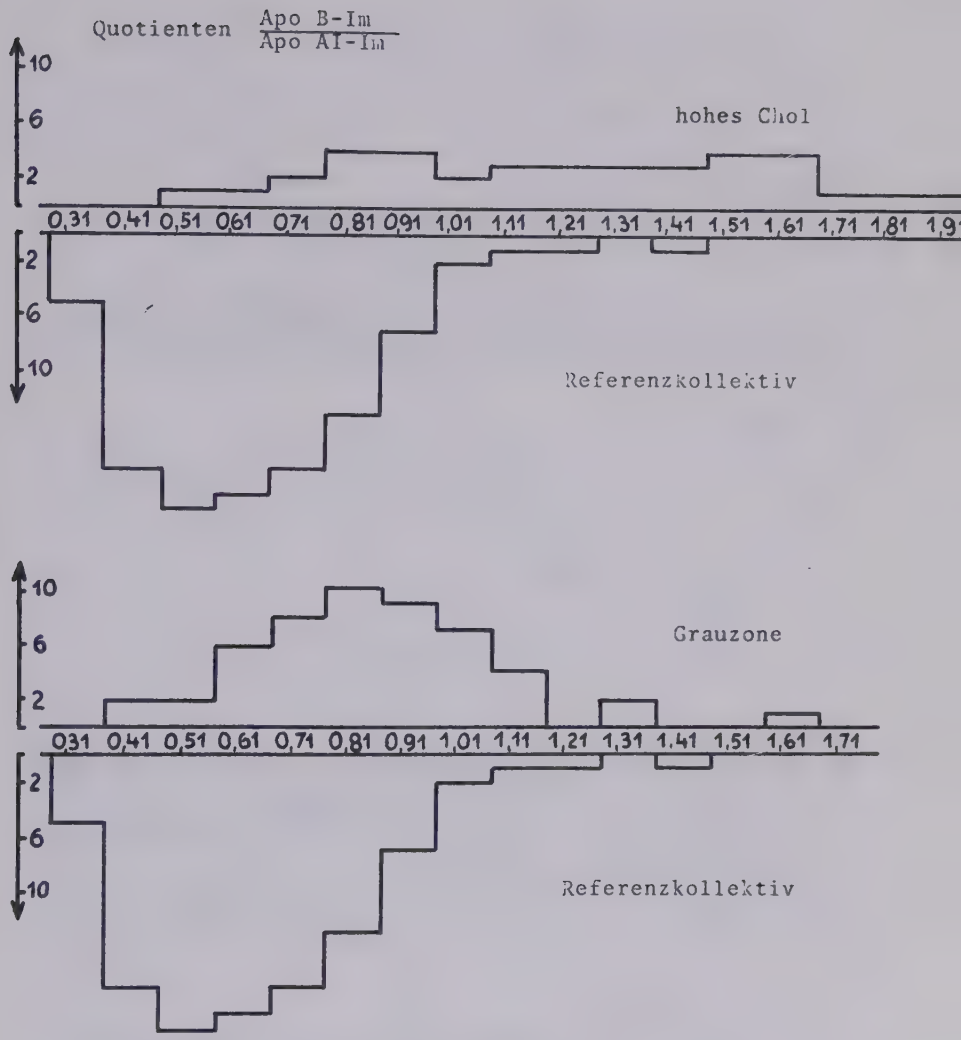


Abb. 31 und Abb. 32 Vergleich der Gruppen "hohes Chol" und "Grauzone" mit dem Referenzkollektiv nach Berechnung der Quotienten Apo B-Im/Apo AI-Im

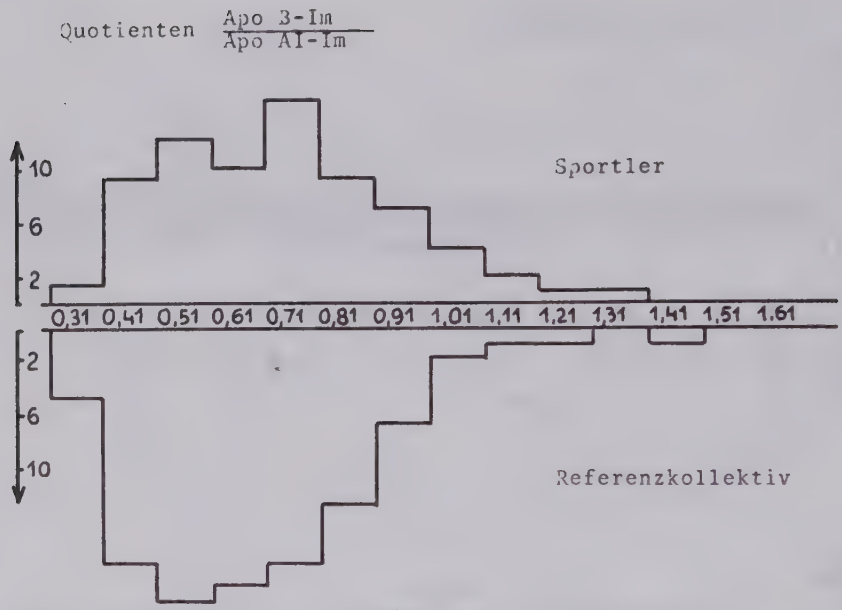


Abb. 33 Quotienten Apo B-Im/Apo AI-Im beim Vergleich Sportler mit Referenzkollektiv

Zu Abb. 28 bis 30

Wie die Abbildungen veranschaulichen, ist eine Unterscheidung meiner Kollektive unter Berücksichtigung des Verhältnisses Apo B-LN/Apo A-LN-Fä nicht möglich, da sich die Histogramme nahezu vollständig überdecken.
Gleiches gilt auch für die Quotienten Apo B-Pa/Apo A-Pa. Deshalb wird auf eine Zeichnung verzichtet.

Zu Abb. 31 bis 33

Für die Gruppe "hohes Chol" finde ich im Vergleich zum Referenzkollektiv insgesamt deutlich größere Quotienten. Allerdings demonstriert die Abb. 31, daß es schwer fällt, eine Entscheidungsgrenze festzulegen. Bei den sich überlappenden Histogrammen in Abb. 32 und 33 ist es unmöglich, einen Unterschied zu erkennen, so daß die Quotienten Apo B-Im/Apo AI-Im nicht als Entscheidungsgrenze herangezogen werden können.

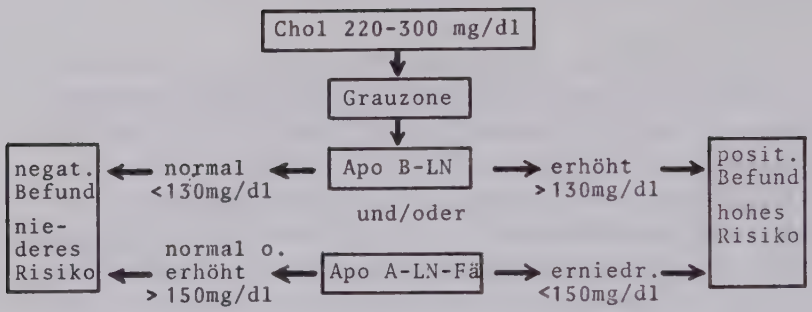
3.10 Differenzierung der "Grauzone" mit Apo A und Apo B

Durch die Bestimmung des Cholesterins wird eine "Grauzone" mit unklaren Patienten offengelegt. Sie liegt beim Cholesterin im Bereich zwischen 220 und 300mg/dl. Wichtig wären Kriterien, die eine eindeutige Entscheidung erlauben, wer in dieser Zone einer Therapie zugeführt werden sollte. Es sind bisher verschiedene Wege eingeschlagen worden, dieses Problem zu lösen. Nach neueren Erkenntnissen scheinen die Bestimmungen der Apolipoproteine am ehesten geeignet, diese weiterführende Differenzierung zu ermöglichen.

3.10.1 Feinrasterdiagnostik mit Apo B-LN und Apo A-LN-Fä

Als oberen Grenzwert für Apo B-LN lege ich 130mg/dl fest, sowie es zur Unterscheidung Referenzkollektiv mit den Gruppen "hohes Chol" von mir gefunden wird (3.8.1 Abb. 13). Dies entspricht auch der Entscheidungsgrenze für ApoB-LN, wie es von der Firma Behring vorgeschlagen wird, und stellt gleichzeitig die Obergrenze des Referenzbereichs dar.
Alle "Grauzone"-Patienten mit Apo B-LN> 130mg/dl haben somit einen positiven Befund, ein hohes Risiko.

Ein zweites Kriterium im Rahmen der Feinraster-Diagnostik stellen nach Firmenangaben Behring Apo A-LN -Fä-Konzentrationen <150mg/dl als untere Referenzwertgrenze dar. Auch dies gilt als prognostisch ungünstig und soll übernommen werden.



Tab. 16 Zur besseren Differenzierung der "Grauzone" mit Apo B-LN und Apo A-LN-Fä modifiziert nach Behring

Für meine "Grauzone" finde ich folgende Ergebnisse (n=51):

Kriterien	Anzahl	≙%	Aussage
Apo B-LN > 130mg/dl und/oder Apo A-LN-Fä <150mg/dl	32	62,7	prognostisch ungünstig, hohes Risiko
Apo B-LN ≤130mg/dl und/oder Apo A-LN-Fä ≥ 150mg/dl	19	37,3	prognostisch günstig, geringes Risiko

Tab. 17 Differenzierung der unklaren Patienten mit Apo A-LN-Fä und Apo B-LN

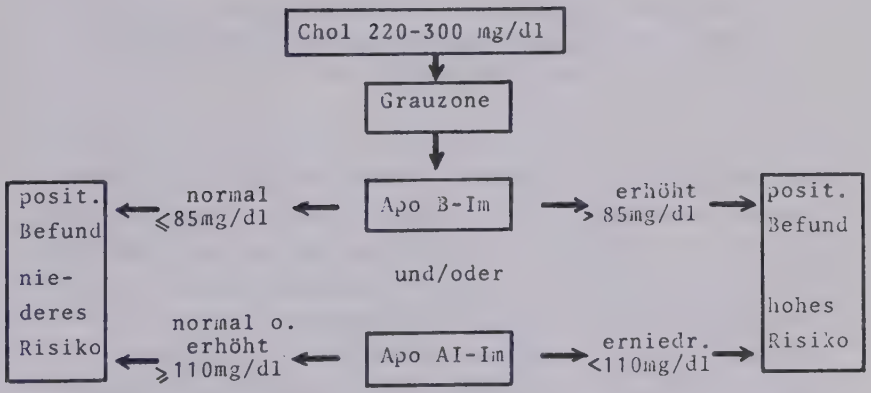
Wie die Tabelle veranschaulicht, wären mit diesen Voraussetzungen 62,7% (n=32) der unklaren Patienten mit einer prognostisch ungünstigen Apolipoproteinkonstellation behaftet, nur einer auf Grund der zu niederen Apo A-LN-Fä-Konzentration. Die restlichen 37,3% hätten eine prognostisch günstige Konstellation und somit ein niederes Risiko.

3.10.2 Feinrasterdiagnostik mit Apo B-Pa und Apo A-Pa

Unter gleichen Bedingungen sollen die Ergebnisse der radialen Immundiffusion Apo A-Pa und Apo B-Pa geprüft werden. Hier haben 64,7% (n=33) meiner unklaren Patienten einen positiven und 35,3% (n=18) einen negativen Befund. Wie oben, zeigt ein Proband Apo A-Pa <150mg/dl.

3.10.3 Feinrasterdiagnostik mit Apo B-Im und Apo AI-Im

Auch mit Apo AI-Im und Apo B-Im soll eine ähnliche Differenzierung versucht werden. Da es mit meinen Kollektiven nicht möglich war, eine klare obere Referenzwertgrenze für Apo B-Im festzulegen, weil die Abweichungen zu den Referenzbereichen der Firma zu groß sind, wird nach Firmenangaben Immuno Apo B-Im > 85mg/dl als prognostisch ungünstig angenommen. Für Apo AI-Im gilt eine ungünstige Prognose bei Werten <110mg/dl.



Tab. 18 Nach Behring modifizierte Tabelle zur Differenzierung der "Grauzone mit Apo B-Im und Apo AI-Im

Die Resultate meines Kollektivs "Grauzone" sind in Tab. 19 dokumentiert (n=51)

Kriterien	Anzahl	≙%	Aussage
Apo B-Im > 85mg/dl und/oder Apo AI-Im <110mg/dl	43	84,3	prognostisch ungünstig, hohes Risiko
Apo B-Im ≤85mg/dl und/oder Apo AI-Im ≥110mg/dl	8	15,7	prognostisch günstig geringes Risiko

Tab. 19 Differenzierung der unklaren Patienten mit Apo AI-Im und Apo B-Im

Die Tabelle zeigt, daß 84,3% der unklaren Patienten eine prognostisch ungünstige Apolipoproteinkonstellation im Rahmen der Differenzierung haben, wenn oben genannte Bedingungen Anwendung finden.
Nur 15,7% hätten eine prognostisch günstige Konstellation und damit ein niederes Risiko.

3.10.4 Feinrasterdiagnostik mit Apo B-Im und Apo AI-Im unter Berücksichtigung der neuen, 1983 modifizierten Referenzbereichgrenzen

Das Vorgehen ist dasselbe wie im vorherigen Abschnitt mit dem Unterschied, daß jetzt die 1983 von der Firma modifizierten Referenzbereiche angenommen werden. Diese stimmen mit meinen selbst erstellten Referenzwerten gut überein. Als Obergrenze für Apo B-Im wird 122mg/dl und als Untergrenze für Apo AI-Im 68mg/dl festgesetzt.
Auf eine tabellarische Darstellung wird verzichtet.
Unter Annahme dieser Grenzen hätten lediglich 13,7% der unklaren Patienten mit einem Chol zwischen 220-300mg/dl eine ungünstige Apolipoproteinkonstellation und 86,3% hätten ein nur geringes Risiko zu tragen.

3.11 Differenzierung der "Grauzone" beim Vergleich Apo B-LN und Apo B-Im

Es soll die Übereinstimmung der Methoden Apo B-LN und Apo B-Im für die "Grauzone" beleuchtet werden. Als obere Referenzwertgrenze wird wie im vorherigen Abschnitt für Apo B-LN 130mg/dl und für Apo B-Im 85mg/dl festgelegt.
In Abb. 34 Darstellung von Apo B-Im gegen Apo B-LN, die Referenzwertgrenzen sind eingezeichnet.

Beide Methoden verdeutlichen einen gemeinsamen positiven Befund bei 27 Probanden. Apo B-Im läßt zusätzlich 11 weitere als "krank" erkennen, die mit Apo B-LN "gesund" erscheinen. Umgekehrt finde ich bei 5 Probanden positive Befunde mit Apo B-LN, die mit Apo B-Im einen negativen Befund ergeben. Diese schlechte Übereinstimmung der beiden Methoden für das Kollektiv "Grauzone" wurde auch schon in Kap. 3.7.2 Tab. 15 mit einem Korrelationskoeffizienten von r=0,54 dokumentiert.

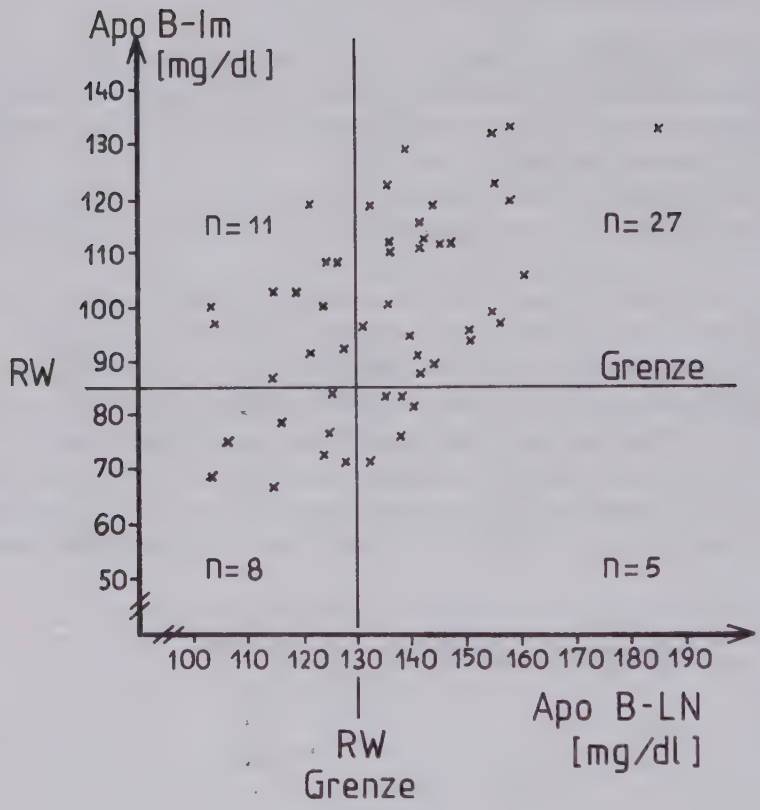


Abb 34 Vergleich von Apo B-LN und Apo B-Im für die Grauzone zur besseren Differenzierung,
die Referenzwertgrenzen sind eingezeichnet

4. Diskussion

4.1 Methodenvergleich

4.1.1 Qualitätskontrollen der verschiedenen immunologischen Methoden

4.1.1.1 Die Präzisionskontrollen

Als Ergebnis der Auswertung einer quantitativen Methode für die Bestimmung der Apo A- und Apo B-Konzentrationen in Humanseren kann festgestellt werden, daß sowohl die immunchemische Bestimmung mit dem Laser-Nephelometer (Behring), wie auch die radiale Immundiffusion mit Partigen^{R}-Platten (Behring) und mit Einschränkung auch die immunologische Bestimmung mit dem Video-Nephelometer (Immuno) für das klinische Laboratorium geeignete Verfahren darstellen.

Dabei schwanken die Variationskoeffizienten für Apo A-LN und Apo B-LN zwischen 4,12 und 5,18 % von Tag zu Tag bzw. zwischen 2,15 und 4,62 % in der Serie. Auch für die radiale Immundiffusion finde ich Variationskoeffizienten zwischen 4,17 und 4,56 %.

Auffallend weniger präzise, vor allem Apo AII-Im, sind die Resultate für Apo AI-Im, Apo AII-Im und Apo B-Im mit Hilfe des Video-Nephelometers. Während die Kontrollen von Tag zu Tag sowohl bei Apo AI-Im als auch bei Apo B-Im Variationskoeffizienten zwischen 8,77 und 9,73 % zeigen, finde ich für Apo AII-Im lediglich VKs > 10 %, wobei Normcontrol Immuno (Nr.063101) mit 17,9 % deutlich aus dem Rahmen fällt.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, daß die selbst gefundenen VKs für die verschiedenen Methoden mit anderen Autoren gut übereinstimmen. So erreichen Fievet-Desreumaux et al. (1979) für die nephelometrische Apo B-Bestimmung eine Präzision in der Serie zwischen 3 und 4,6 % und zwischen 7,5 und 7,9 %

von Tag zu Tag. (36) Ebenso zeigen Girault et al. (1980) für die Apo A-Bestimmung Variationskoeffizienten von 4,16 % in der Serie und 4,4 % von Tag zu Tag und auch Rosseneu et al. (1981) und Lopes-Virella et al. (1980) erreichen eine Präzision für Apo AI von 5 % bzw. 2,5 % in der Serie und 7 % bzw. 6,3 % von Tag zu Tag. (41,63,80)

4.1.1.2 Die Richtigkeitskontrollen

Zu den Richtigkeitskontrollen der immunologischen Methoden bei der Apolipoprotein-Bestimmung müssen einige kritische Anmerkungen ausgeführt werden.
Für manche immunologische Methoden sind zum Zeitpunkt der Messung keine Richtigkeitskontrollen erhältlich.
Ist ein Kontrollserum vorhanden, so erreiche ich die Richtigkeit im Vertrauensbereich nur, wenn für die Methode der Firma I das Kontrollserum der Firma I benutzt wird oder die Methode der Firma B mit Richtigkeitsserum der Firma B kontrolliert wird. Es war nicht möglich, mit dem Kontrollserum der einen Firma und der Methode der anderen Firma bzw. umgekehrt "richtige" Ergebnisse zu erzielen. Daher ist es nur begrenzt erlaubt, eine Aussage über die Richtigkeit dieser Bestimmungen zu machen.
Bestrebungen zur Standardisierung scheinen hier dringend nötig, so wie sie zum Beispiel für andere Serumproteine im Rahmen der Internationalen Standardisierung quantitativer Plasma-Protein-Bestimmungen, von der WHO definiert, bereits vorliegen. (76)

4.1.2 Linearitätsprüfung durch Verdünnungsreihen

Die Linearitätsprüfung gilt als unabdingbare Voraussetzung für zuverlässige Analysenresultate.
So ist sowohl für Apo A-LN und Apo B-LN (Behring) als auch für Apo AI-Im, Apo AII-Im und Apo B-Im mit Korrelationskoeffizienten (r)> 0,99 über die gesamten Meßbereiche hinweg eine ausgezeichnete Linearität gewährleistet.

Im Falle der radialen Immundiffusion mittels Partigen^{R}-Platten konnten von Becker et al. (1980) ähnliche Ergebnisse erzielt werden. (10)

4.1.3 Referenzwerte

Beim Vergleich der Referenzwerte, einerseits der Firmenangaben und andererseits der eigenen Referenzbereiche, finde ich gute Übereinstimmung für die Methoden der radialen Immundiffusion und für die Behring-Laser-Nephelometrie-Methoden. Allerdings weichen meine Referenzbereiche für Apo AI, Apo AII und Apo B (Immuno) deutlich von den Firmenangaben von 1981 ab. Dafür wird keine Erklärung gefunden. Erst 1983 modifiziert die Firma die Referenzwerte so, daß auch hier brauchbare Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen erlangt wird (siehe auch Kap. 3.3). (52)

4.1.4 Einfluß von Hämoglobin und Bilirubin auf die immunologische Bestimmung der Apolipoproteine mit dem Behring-Laser-Nephelometer

4.1.4.1 Hämoglobin

Wie in Kap. 3.4.1 dargestellt, findet man lediglich eine meßfehlerbedingte Streuung der Apo A- und Apo B-Meßwerte bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 2 g/dl und kann bis dahin den Storeinfluß durch Hb ausschließen, was einen Vorteil gegenüber den Fällungsmethoden mit anschließender Cholesterinbestimmung (HDL-Chol) darstellt. Munz und Jilek (1979) zeigen nämlich, daß mit zunehmenden Hb-Mengen schon ab geringen Hb-Konzentrationen im Serum falsch hohe HDL-Cholesterinwerte ermittelt werden. (72)

4.1.4.2 Bilirubin

So wie Munz et al. (1979) für die HDL-Cholesterin-Bestimmung bis zu einer Bilirubin-Konzentration von 10 mg/dl keine abweichenden Werte sehen, kann ich auch für Apo A und Apo B

bis zu einer Bilirubin-Konzentration von 20 mg/dl keine systematische Abweichung nachweisen. (72)
Zusammenfassend ist zu sagen, daß die immunologische Bestimmung von Apo A und Apo B für Hämolyse und Bilirubin als Störparameter keiner Beeinflussung unterliegen, was zur weiteren Absicherung dieser Methoden beiträgt.

4.1.5 Einfluß der Aufbewahrungsart auf die Stabilität von Lipoproteinen

Die Stabilität der zu messenden Proben ist zur Beurteilung der Meßergebnisse von entscheidender Bedeutung, da zwischen Probengewinnung und der Durchführung der Bestimmung ein gewisser Zeitraum verstreicht. Gleichzeitig muß die Frage geklärt werden, ob Proben zur erweiterten Lipiddiagnostik versandt werden können. Da einerseits nach Firmenangaben möglichst nur frische Serumproben untersucht werden sollen und andererseits die Angaben anderer Autoren zur Aufbewahrungsart sehr unterschiedlich sind, war es nötig, selbst den Einfluß der Aufbewahrungsart auf die Stabilität von Lipoprteinen zu überprüfen. (12,13,51)
Gemessen werden:
Gesamtcholesterin, TGL, HDL-Chol, LDL-Chol (errechnet), Apo A und Apo B.
Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5 verdeutlichen, daß eine Aufbewahren von Serumproben bei Raumtemperatur (20°C) teilweise ungeeignet ist.
Vor allem für Apo A erhält man schon ab dem 5. Tag falsch niedere Konzentrationen. Dagegen hlten sich Apo B, HDL-Chol und LDL-Chol über drei Wochen stabil.
Bei Kühlschranktemperatur (4°C) bleiben alle Bestimmungen bis zum 21. Tag stabil mit Ausnahme von Apo A, das nur bis zum 14. Tag haltbar ist und dann zuerst abfällt.
Einfrieren von Serumproben bei -20°C oder -70°C ist durchaus möglich, es sollte jedoch beim Arbeiten mit immunologischen Methoden ein häufiges Auftauen vermieden werden.
Zu ähnlichen Resultaten kommen auch Munz und Jilek (1979).

Sie ermitteln über einen Zeitraum von 14 bzw. 9 Tagen bei 4°C und bei Raumtemperatur für HDL-Chol gleichbleibende Werte. (72) Auch Assmann et al. (1981) weisen fast vollständige Wiederfindung von Apo AI nach 6-9 tägiger Lagerung bei 4°C nach. (7)
Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen bei Kühlschranktemperatur steht die Arbeit von Albers et al. (1980). Sie finden eine Stabilität für Apo AI bei 4°C über 6 Wochen. (3)
Bezüglich des Einfrierens stimmen meine Resultate mit denen von Girault et al. (1980) gut überein. Sie zeigen eine Haltbarkeit für Apo A und Apo B über einen Monat bei -20°C. (41) Ebenso demonstrieren Finley et al. (1978) die Stabilität von HDL-Chol bis 3 Monate bei -20°C. (37)

Es kann daher zusammenfassend gesagt werden, daß die Lagerung von Serumproben unkritisch ist.
Das Einfrieren der Seren bei -20°C oder -70°C ist ohne Einfluß auf die Ergebnisse möglich. Auch im Kühlschrank (4°C) und bei Raumtemperatur (20°C) sind die Meßwerte stabil. Einzige Ausnahme bildet dabei Apo A. Hier finde ich bei Zimmertemperatur schon vom 5. Tag an deutlich niederere Resultate, und im Kühlschrank fallen die Werte nach 2 Wochen ab.
Für die vorliegende Arbeit werden die Serumproben portioniert bei -20°C im Gefrierschrank eingefroren und nach einmaligem Auftauen verworfen.

4.1.6 Methodenvergleich mit dem Student-t-Test

Im Rahmen des Methodenvergleichs wird der Student-t-Test durchgeführt. Damit werden die verschiedenen Apolipoprotein-Bestimmungs-Methoden am Gesamtkollektiv im Sinne eines Mittelwertvergleichs überprüft. Bei den durchgeführten Apo A-Bestimmungen erhalte ich die beste Übereinstimmung, also ohne signifikante Mittelwertabweichung, für die Methoden Apo A-LN-Fä und Apo A-Pa. Die signifikant höchsten Ergebnisse ergeben sich für Apo A-LN, und Apo AI-Im liegt erwartungsgemäß deutlich niederer als alle anderen.

Beim Vergleich von Apo B-LN, Apo B-Pa und Apo B-Im findet man ebenfalls signifikante Unterschiede. Die höchsten Resultate erreiche ich mit Apo B-LN, gefolgt von Apo B-Pa. Die Meßwerte für Apo B-Im liegen am niedersten.
(Apo B-LN > Apo B-Pa > Apo B-Im)
Bei all diesen immunologischen Methoden sind deshalb dringend Standardisierungsmaßnahmen bezüglich der verschiedenen Antikörper und Standards wie auch der Konzentrationen nötig, ähnlich wie sie für das Gesamtcholesterin, von der Standardisierungskommission der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie herausgegeben, schon bestehen.

4.1.7 Methodenvergleich mit Hilfe der Korrelationen

Um eine weitere Vergleichbarkeit der Fettstoffwechselparameter untereinander zu prüfen, wird jede Methode mit allen anderen korreliert. Dabei ist der Korrelationskoeffizient (r) ein Schätzwert eines Maßes für den Grad der linearen Abhängigkeit zweier Methoden x und y.
So wie Drygas (1980) eine ausgezeichnete lineare Beziehung zwischen LDL-Chol und Gesamt-Chol darstellt und Heuck (1977) eine gute Korrelation für Apo B (RID) mit Gesamt-Chol zeigt, finde auch ich für das Gesamtkollektiv eine gute Übereinstimmung von Apo B-LN,Apo B-Pa und Apo B-Im mit dem Gesamt-Chol. (30,48)
Ebenso korrelieren die drei Apo B-Methoden untereinander und dies in Übereinstimmung mit Becker et al. (1980). Sie finden zufriedenstellende Korrelation von Apo B-LN und Apo B-Pa über den gesamten Meßbereich. (10)
Für die Apo A-Bestimmungen erweist sich unter den einzelnen Gruppierungen von Wertepaaren die Regression der Serumkonzentration von Apo A-LN-Fä auf Apo A-LN als Funktion mit dem engsten Zusammenhang, gefolgt von den Regressionen Apo A-LN-Fä auf Apo A-Pa und Apo A-LN-Fä auf Apo AI-Im. Genauso brauchbar sind die Zusammenhänge von Apo A-LN auf Apo A-Pa, von Apo A-LN auf Apo AI-Im und begrenzt von Apo A-Pa auf Apo AI-Im. Weniger eng sind die statistischen Zusammenhänge von Apo A-LN, Apo A-LN-Fä,

Apo A-Pa und Apo AI-Im auf Apo AII-Im.
Diese Resultate stimmen mit den Veröffentlichungen von Becker et al. (1980) und Mertz et al. (1981) ausgezeichnet überein. Beide arbeiten jedoch mit erheblich kleineren Patientenkollektiven. (10,67)

4.2 Unterschiede der verschiedenen Apo A- und Apo B-Methoden beim Gruppenvergleich mittels Student-t-Test, anhand von Histogrammen und Korrelationen

4.2.1 Mittelwertvergleich der einzelnen Gruppen untereinander

Sowohl für die Gruppe 2 (Sportler) als auch für die Gruppe 6 (Chol >300mg/dl, TGL >175mg/dl) erhalte ich signifikant höhere Mittelwerte aller Apolipoprotein-Bestimmungen im Vergleich zum Referenzkollektiv. Gleiches gilt für Gruppe 7 ("Grauzone") mit Ausnahme Apo AI-Im und Apo AII-Im, die nicht höher liegen. Diese Ergebnisse sollen im Kapitel 4.2.3 (Histogramme) weiter überprüft werden.
Auffallend erscheint der Befund beim Vergleich der Gruppe 5 (Chol >300mg/dl, TGL <175mg/dl) und 6 (Chol >300 mg/dl, TGL >175mg/dl). Keine der durchgeführten Apolipoprotein-Bestimmungen zeigt eine signifikante Abweichung im Mittelwertvergleich. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß bei Chol >300mg/dl der Einfluß der TGL-Werte auf die Konzentration von Apo A und Apo B unerheblich zu sein scheint. Anders beim Vergleich Referenzkollektiv (Chol <220mg/dl, TGL <175mg/dl) mit Gruppe 4 (Chol <220mg/dl, TGL >175mg/dl). Hier imponieren eindeutig höhere Mittelwerte für Apo B-LN, Apo B-Pa und Apo B-Im. Daraus leite ich ab, daß vor allem bei "normalen" Cholesterin-Konzentrationen der Einfluß der Apo B-haltigen, TGL-reichen VLDL als Störgröße auffällt.

Die verschiedenen Apo A-Bestimmungen verhalten sich unterschiedlich. In Übereinstimmung mit Girault et al. (1980) finde ich niederere Apo AI-Im-Konzentrationen bei hohen

TGL-Werten. Allerdings läßt sich diese Tendenz für Apo A-LN-Fä, Apo A-LN, Apo A-Pa und Apo AII-Im nicht nachweisen. (41)

4.2.2 Korrelationen der verschiedenen Apo A- und Apo B-Methoden bei Betrachtung der einzelnen Gruppen

Nachdem am Gesamtkollektiv eine gute Korrelation der drei Apo B-Methoden mit Gesamtcholesterin, ausgezeichnete Übereinstimmung der Apo B-Methoden untereinander und unterschiedlich enge Zusammenhänge der verschiedenen Apo A-Methoden aufgezeigt werden konnten, sollen jetzt die Korrelationen bei Betrachtung der einzelnen Patientengruppen diskutiert werden.
Dabei liegen die Korrelationskoeffizienten der drei Apo B-Methoden im Vergleich zum Gesamtcholesterin nur zwischen 0,2 und 0,67.
Die Regression von Apo B-LN auf Apo B-Pa bzw. Apo B-Im zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Dabei fällt mit steigenden TGL-Werten (Gruppe 4 und 6) eine Abnahme der Vergleichbarkeit auf; vermutlich ein Störeinfluß der Apo B aus den Chylomikronen und VLDL auf die Apo B-Bestimmungen. Alle anderen Gruppen demonstrieren ausreichende Übereinstimmung der drei untersuchten Apo B-Methoden.
Korreliert man die fünf immunologischen Apo A-Methoden miteinander, so imponiert bei Apo A-LN, Apo A-LN-Fä und Apo A-Pa eine ausgezeichnete Vergleichbarkeit. Allerdings zeigt Apo AI-Im nur mäßige Übereinstimmung mit den übrigen Apo A-Lipoproteinen. Der Versuch Apo AII-Im mit den anderen immunologischen Methoden zu vergleichen, bringt nur unbefriedigende Resultate.
Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch andere Autoren, die jedoch nur wenige Verfahren korrelieren. Heuck (1977), Becker et al. (1980) sowie Mertz und Mitarbeiter (1981). (10,48,67)
Interessant ist außerdem eine anhaltend negative Korrelation beim Vergleich der TGL mit Apo A-Lipoproteinen. Es gilt für Gruppen mit TGL-Konzentrationen <175mg/dl (1,3,5)!

Dieser Befund erscheint etwas unerwartet, da Girault et al. (1980) eine negative Korrelation von Apo A nur auf hohe TGL-Konzentrationen finden und Assman et al. (1980) zwar eine negative Korrelation von HDL-Cholesterin auf triglyzeridreiche Seren beobachten aber keinen negativen Zusammenhang von Apo AI versus hohe TGL-Werte nachweisen können. (6,41)
Eine Sonderstellung nimmt das Sportlerkollektiv ein (Gr.2), da hier die immunologischen Methoden mit der Lipoproteinelektrophorese verglichen werden können. Erwartungsgemäß erreiche ich sehr gute Übereinstimmung von β-Chol mit Gesamtcholesterin. Jedoch finde ich nur mäßige Korrelationen der immunologischen Apo B-Methoden mit β-Chol und sogar eine schlechte Vergleichbarkeit der Apo A-Bestimmungen mit α-Cholesterin. Dies steht im Gegensatz zu Endler et al. (1981), die für β-Chol im Vergleich mit Apo B (RID, Behring) hochspezifische Zusammenhänge sehen und auch konträr zu Weinstock und Mitarbeitern (1981), die gute Übereinstimmung von Apo AI mit α-Chol belegen. (35,92)

So kann ich zumindest feststellen, daß die Ergebnisse der immunologischen Apolipoprotein-Bestimmungen nur sehr begrenzt mit denen der Lipoproteinelektrophorese zu vergleichen sind, wenn es sich um sportlich aktive Probanden handelt.

4.2.3 Vergleich der Gruppen mit Histogrammen

Dabei soll diskutiert werden, ob mit den verschiedenen Apo B-bzw. Apo A-Methoden eine Zuordnung zu Risikogruppen möglich ist oder die Gruppen eindeutig zu unterscheiden sind. Beim Vergleich des Sportkollektivs mit dem Referenzkollektiv fallen für alle Apolipoproteine geringgradig höhere Konzentrationen, wie auch beim Mittelwertvergleich, auf. Jedoch erweist es sich als schwierig, bei den sich weit überlappenden Histogrammen, einen eindeutigen Unterschied für die Sportler herauszuarbeiten.
So halte ich fest: Mit Apo B und Apo A alleine ist es un-

möglich, einen Sportler von einem "normalen" Probanden zu unterscheiden. Anders verhält es sich beim Vergleich der Kollektive "hohes Chol" mit Referenzkollektiv. Wie man schon für Chol > 300mg/dl annimmt, ist es auch mit Apo B-LN und Apo B-Pa möglich, eindeutig zur Gruppe "hohes Risiko" zuzuordnen, wenn Apo B > 130mg/dl gefunden wird. Gleiches gilt für Apo B-Im.
Dagegen tragen die Bestimmung von Apolipoproteinen A als Diskriminatoren nicht zur Differenzierung beim Vergleich "hohes Chol" mit Referenzkollektiv bei.
Nun zur Unterscheidung "Grauzone" mit Referenzkollektiv. Genau wie beim Vergleich "hohes Chol" mit Referenzkollektiv, ist auch hier alleine mit den verschiedenen Apolipoproteinen A eine Unterscheidung der beiden Gruppen nicht möglich. Apo A-Bestimmungen helfen nicht bei der Differenzierung der "Grauzone" weiter.
Besser eignen sich die Apolipoproteine B. Sowohl für Apo B-LN als auch Apo B-Pa kann ich Probanden mit Werten <100mg/dl eindeutig zum Kollektiv "niederes atherogenes Risiko" zuordnen. Es folgt dann ein Überlappungsbereich (101-130mg/dl). In diesem steigt mit zunehmender Konzentration die Wahrscheinlichkeit stetig an, zur Gruppe "hohes Risiko" zu gehören. Bei Resultaten > 130mg/dl gelingt eine klare Zuordnung. Diese gilt nicht für Apo B-Im. Der Versuch einer Differenzierung von "Grauzone" und Referenzkollektiv bringt damit nur unbefriedigende Ergebnisse.
Den von mir gezogenen Schlußfolgerungen stehen die Ergebnisse einer Studie von Whayne et al. (1981) keineswegs entgegen. Danach soll bei einer Gruppe von Patienten mit Serumcholesterinspiegeln von weniger als 265mg/dl Apo B die verläßlichste Bezugsgröße für ein koronares Erkrankungsrisiko sein. (94)

4.3 Das Verhältnis Apo B/Apo A

Schon 1980 belegen Zimmer et al., daß die Bestimmung des LDL/HDL-Quotienten sowohl nach den statistischen Daten großer epidemiologischer Studien als auch unter dem Aspekt einer differenzierten Betrachtung des Lipoproteinstoffwechsels der alleinigen Bestimmung von Gesamt-Chol und HDL-Chol überlegen ist. (16,24,68-70,103)
Zu ähnlichen Aussagen kommen auch Wieland und Mitarbeiter (1978) und Cremer et al. (1981). (25,98)

Einen hohen prädiktiven Wert bei der Beurteilung der Fettstoffwechsellage in prognostischer Hinsicht soll ebenso das Verhältnis Apo B/Apo A haben.
Interessanterweise gelingt es mir nicht, nach Berechnen der Verhältnisse Apo B-LN/Apo A-LN-Fä, Apo B-Pa/Apo A-Pa und Apo B-Im/Apo A-Im und einem anschließenden Vergleich der Gruppen "hohes Chol", "Grauzone" oder Sportler mit dem Referenzkollektiv, eine solche Feststellung zu treffen. Es ist unmöglich, die Gruppen zu unterscheiden oder eine Entscheidungsgrenze festzulegen, da sich die Histogramme der Quotienten fast vollständig überlappen.
Ich finde mich hier in Übereinstimmung mit Mertz et al. (1981). Sie stellen fest, daß der sogenannte "Atherosklerose-Index", d.h. das Konzentrationsverhältnis von LDL/HDL, nur schlecht mit dem Konzentrationsverhältnis Apo B/Apo A korreliert. (67)

Zusammenfassend ist zu sagen: Das Verhältnis Apo B/Apo A als Diskriminator für ein atherogenes Risiko scheint auf Grund der Meßwerte alleine ungeeignet, um die verschiedenen Klientele zu unterscheiden.

4.4 Feinrasterdiagnostik mit Apo B und Apo A

Durch Bestimmung des Geamtcholesterins wird eine "Grauzone" mit unklaren Patienten offengelegt. Sie liegt im Bereich 220-300mg/dl. In diesem Grenzbereich ist aus der Konzentration der Blutlipide allein das Risiko der koronaren Herzkrankheit nicht ableitbar. So haben Assmann et al. schon 1979 in diesem "unklaren Bereich" mit Bestimmung von HDL-Chol und LDL-Chol ergänzende Information erhalten, Grenzen für HDL- und LDL-Chol festgelegt und in Gruppen mit verschiedenen hohem Risiko eingeteilt. (5)
Im gleichen Jahr stellen Wieland und Mitarbeiter unter Verwendung der Lipoproteinelektrophorese eine Einteilung in drei Risikogruppen vor. Als Kriterien gelten das gewonnene β-Chol bzw. das Verhältnis β-Chol/α-Chol. (95,96)

Im Sinne der Erfassung einer atherogenen Risikokonstellation scheint nach neueren Erkenntnissen die Bestimmung von Apolipoproteinen am ehesten geeignet, diese weiterführende Differenzierung zu ermöglichen.
Dabei erreichen mit Apo B-LN>130mg/dl und/oder Apo A-LN-Fä <150mg/dl als Kriterien 37,3 % meiner "Grauzone" eine prognostisch günstige Konstellation und 62,7 % wären mit einer ungünstigen Konstellation behaftet. Nahezu identische Ergebnisse liefern Apo B-Pa und Apo A-Pa. 35,3 % versus 64,7 %.
Bei gleichem Vorgehen, unter Berücksichtigung der anderen Referenzwertgrenzen, sind mit Apo B-Im>85mg/dl und/oder Apo AI-Im<110mg/dl 84,3 % der "Grauzone" zum Kollektiv "hohes Risiko" zuzuordnen und 15,7 % hätten ein "geringes Risiko".
Ein völlig anderes Bild erhalte ich unter Annahme der 1983 von der Firma modifizierten Referenzwerte, die mit meinem selbst erstellten Referenzbereich gut übereinstimmen. Mit Apo B-Im>122mg/dl und/oder Apo AI-Im<68mg/dl tragen lediglich 13,7 % der "Grauzone" eine ungünstige Apolipoproteinkonstellation und 86,3 % wäre ein "geringes atherogenes Risiko" zuzuschreiben.

Zum einen sollte dieses unwahrscheinliche, konträre Ergebnis dazu beitragen,die Referenzwerte für Apo B-Im und Apo AI-Im erneut zu überprüfen und eventuelle methodische Fehler zu korrigieren. Zum anderen dokumentiert es erneut die schlechte Vergleichbarkeit von Apo B-Im mit Apo B-LN für die Gruppe "Grauzone" (r=0,54, Kap. 3.11).

4.5 Praktische Schlußfolgerungen

Zur Diagnosefindung in der Praxis gelten die Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden als unbestrittenes Basisprogramm. Damit können die Patienten in drei Hauptgruppen eingeteilt werden (Chol <220mg/dl, Chol 220-300mg/dl, Chol> 300mg/dl). Besonderes Interesse gilt der "Grauzone" mit Cholesterinwerten zwischen 220 und 300mg/dl.

Zur weiteren Differenzierung im Rahmen der Fettstoffwechseldiagnostik wird unter anderem die immunologische Bestimmung von Apo A und Apo B empfohlen. Mit viel Optimismus wird von verschiedenen Firmen dafür geworben. Dabei spielen sicher auch kommerzielle Interessen eine große Rolle.

Bei genauerer Prüfung der immunologischen Methoden im Vergleich zeigen sich jedoch erhebliche Schwierigkeiten, die Patienten eindeutig zu Risikogruppen zuzuordnen, da die Ergebnisse teilweise sehr unterschiedlich sind und eine deutliche Firmenabhängigkeit aufweisen. Die Aussagen der verschiedenen Firmen bezüglich einer Feinrasterdiagnostik mit Apo A und Apo B können somit nicht eindeutig bestätigt werden. Deshalb ist ein Einsatz von immunologischen Methoden zur Bestimmung von Apolipoproteinen zum jetzigen Zeitpunkt in der Routine noch nicht sinnvoll.

5. Zusammenfassung

An 305 Serumproben, die von stationären und ambulanten Patienten beiderlei Geschlechts der Medizinischen Universitätsklinik und von männlichen Sportlern stammen, werden verschiedene immunologische Methoden der Apolipoprotein-Bestimmung miteinander verglichen, nachdem anhand der gefundenen Cholestrin- und Triglyzerid-Werte in verschiedene Klientelgruppen (1-7) eingeteilt worden war. Am Sportkollektiv wird zusätzlich die Lipoproteinelektrophorese im Vergleich mit den Apolipoproteinen beleuchtet. Außerdem sollen die Apolipoproteine als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko diskutiert werden.

Folgende immunologische Methoden der Apolipoprotein-Bestimmung gelangen zum Methodenvergleich:
Apo A und Apo B (Behring-Laser-Nephelometrie)
Apo A und Apo B (RID, M-Partigen^{R}-Platten, Behring) und
Apo AI, Apo AII und Apo B (Immuno, Video-Nephelometrie).

Dabei erweisen sich die Präzisionskontrollen als gut (Ausnahme: Apo AII-Im). Die Richtigkeitskontrollen bedürfen weiterer Standardisierungsmaßnahmen. Die selbst erstellten Referenzwerte stimmen weitgehend mit den Firmenangaben überein (Ausnahme: Apo AI-Im, Apo AII-Im, Apo B-Im). Auch für diese werden die Referenzwerte von der Firma 1983 so modifiziert, daß gute Übereinstimmung mit den eigenen Referenzbereichen besteht.
Alle Methoden halten einer Linearitätsprüfung über den gesamten Meßbereich ausgezeichnet stand.
Hämoglobin und Bilirubin beeinflussen Apo A-LN und Apo B-LN (Behring) nicht.
Die Lagerung von Serumproben ist unkritisch. Einfrieren bei - 20°C oder - 70°C ist ohne Bedenken möglich. Ein häufiges Auftauen soll vermieden werden. Auch im Kühlschrank (4°C) und bei Raumtemperatur (20°C) sind die Meßwerte stabil. Ausnahme bildet Apo A. Bei Zimmertemperatur fallen die Werte ab dem 5. Tag und bei 4°C nach 2 Wochen ab.

Mit folgenden Verfahren werden die Methoden miteinander verglichen:
Student-t-Test, Korrelationen und Histogrammen.
Im Rahmen des Mittelwertvergleichs für das Gesamtkollektiv unterscheiden sich sowohl die Apo A- als auch die Apo B-Methoden untereinander.
Die Regression der drei Apo B-Methoden auf das Gesamtcholesterin beweist einen engen Zusammenhang. Gleiches gilt für die drei Apo B-Bestimmungen untereinander. Unterschiedlich sind die Korrelationen der Apo A-Methoden im Vergleich.

Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen erhalte ich:
Erwartungsgemäß Unterschiede im Mittelwertvergleich,
gute bis genügende Übereinstimmung der Apo A-Methoden (Ausnahme AII-Im),
Abnahme der Vergleichbarkeit der drei Apo B-Methoden mit steigenden Triglyzerid-Werten,
eine negative Korrelation beim Vergleich TGL mit Apo A-Lipoproteinen,
für das Sportkollektiv im Vergleich zum Referenzkollektiv mäßige Korrelationen der immunologischen Apo B-Verfahren mit β-Chol (Elektrophorese) und
schlechte Vergleichbarkeit der Apo A-Bestimmungen mit α-Chol (Elektrophorese).
Da die einzelnen Gruppen außerdem anhand von Histogrammen verglichen werden, kann ich feststellen, daß die Apo A-Methoden alleine als Diskriminatoren wenig zur Differenzierung beitragen. Dagegen eignen sich die Apo B-Methoden zur Unterscheidung der Gruppen "hohes Chol" mit dem Referenzkollektiv und mit Einschränkung (Apo B-Im) "Grauzone" mit Referenzklientel.

Die Sportler können mit keinem Apolipoprotein vom Referenzkollektiv unterschieden werden.

Das Verhältnis Apo B/Apo A als Diskriminator für ein atherogenes Risiko bleibt weit hinter den Erwartungen zurück.

Eine Feinrasterdiagnostik mit Apo A und Apo B ist methodisch möglich. Als wichtigster Diskriminator erweist sich Apo B. Da man jedoch mit den verschiedenen immunologischen Methoden bezüglich einer Risikovorhersage zu recht unterschiedlichen Ergebnissen gelangt und eine deutliche Firmenabhängigkeit besteht, scheinen Standardisierungsmaßnahmen dringend nötig. Zum jetzigen Zeitpunkt kann die Bestimmung von Apo A und Apo B zur Feinrasterdiagnostik für die Routine noch nicht sinnvoll genützt werden.

Der rasche biochemische Fortschritt auf dem Sektor der Fettstoffwechselkrankheiten hat komplexe Zusammenhänge geoffenbart, welche die Lipidtheorie der Arteriosklerose nicht in Frage stellen, sondern eine differenziertere Beurteilung von Lipoproteinen und Apolipoproteinen in der Atherogenese ermöglicht. Wegen der großen Heterogenität der Apolipoproteine wird man in Zukunft den immunologischen Methoden in der Lipoproteindiagnostik noch mehr Augenmerk zuwenden müssen.

LITERATURVERZEICHNIS

1 Alaupovic P. Structure and function of plasmalipoproteins with particular regard to hyperlipoproteinemias and atherosclerosis
Ann Biol Clin 38: 83-95 (1980)

2 Alaupovic P, Kostner G, Lee D M, Mc Connathy W J Magnani H N.
Peptide composition of human plasma apolipoproteins A, B and C
Expos Annu Biochim Med 31: 145-168 (1972)

3 Albers C C, Cheung M C, Wahl P W.
Effect of storage on the measurement of apolipoproteins AI and AII by radial immunodiffusion
J lipid Res 21: 874-878 (1980)

4 Allain J J. Enzymatic determination of the serum cholesterol
Clin Chem 20: 470-475 (1974)

5 Assmann G. Lipiddiagnostik heute
Der Internist 20: 559-564 (1979)

6 Assmann G, Oberwittler W, Schulte H, Schriewer H, Funke H, Epping P H, Hauss W H.
Prädiktion und Früherkennung der koronaren Herzkrankheit
Der Internist 21: 446-449 (1980)

7 Assmann G, Schriewer H und Funke H.
Zur Richtigkeit der HDL-Cholesterin- und HDL -Apoprotein AI-Bestimmung
J Clin Chem Clin Biochem 19: 273-278 (1980)

8 Bachorik P S, Wood P D, Albers J J, Steiner P.
Plasma high density lipoprotein cholesterol concentration determined after the removal of other lipoproteins by Heparin/Mg^{++} precipitation or by ultracentrifugation
Clin Chem 22: 1828-1834 (1976)

9 Bartholomé M, Wieland H and Seidel D.
Quantification of plasma lipoprotein cholesterol: A simple procedure for enzymatic determination of cholesterol in electrophoretically separated lipoproteins
Clin Chim Acta 104: 101-104 (1980)

10 Becker W, Schäfer W, Ziegenbein W.
Die immunchemische Bestimmung der Apolipoproteine A und B: Standardisierung und Normalwerte
Laboratoriumsblätter 30: 56-65 (1980)

11 Behringwerke AG Frankfurt/Main.
Behring Laser-Nephelometer
Bedienungsanleitung (1979)

12 Behringwerke AG Frankfurt/Main.
Bestimmung von Apolipoprotein A und Apolipoprotein B Arbeitsanleitung (1981)

13 Behringwerke AG Marburg.
Bestimmung von Apolipoprotein A mit M-Partigen^{R}
Arbeitsanleitung (1979)

14 Behringwerke AG Marburg.
Immundiffusionsplatten für die quantitative Plasmaprotein-Bestimmungen mit Bezugswertetabellen Arbeitsanleitung (1979)

15 Berchthold B und Berger M.
HDL-Cholesterin, ein Schutzfaktor gegen die koronare Herzkrankheit
Dtsch med Wschr 103: 1537-1540 (1978)

16 Berg K, Børressen A L, Dahlén G.
Serum high density lipoprotein and other atherosclerotic heart disease
Lancet I: 499-502 (1976)

17 Böhringer Mannheim GmbH Diagnostica.
Arbeitsanweisung Cholesterin mit einem SMA^{R} 6/60 und SMA^{R} 12/60 (1977)

18 Böhringer Mannheim GmbH Diagnostica.
Testfibel Cholesterin (1978)

19 Böhringer Mannheim GmbH Diagnostica.
Testkombination HDL-Cholesterin
Arbeitsanleitung (1979)

20 Böhringer Mannheim GmbH Diagnostica.
Triglyzeride vollenzymatisch (UV-Test)
Technicon SMA^{R} 12/60 (1978)

21 Brewer B, Schäfer E J, Zech L J, Osborne J C Jr.
Lipoproteine: Struktur, Funktion und Stoffwechsel
in Lipoproteine und Herzinfarkt
Witzstrockverlag Baden-Baden: 7-16 (1979)

22 Burstein M, Scholnick H R and Marfin R.
Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions
J lipid Res 11: 583-395 (1970)

23 Carew T E, Koschinsky T, Hayes S B, Steinenberg D.
A mechanism by which high density lipoproteins may slow the atherogenic process
Lancet I: 1315-1317 (1976)

24 Castelli W P, Doyle J T, Gordon T.
HDL-cholesterol and other lipids in coronary heart disease: The cooperative lipoprotein phenotyping study
Circulation 55: 767-772 (1977)

25 Cremer P, Wieland H, Weise M and Seidel D.
Serum Lipoproteins, Apoproteins and Coronary Artery Disease: Comparison of the Lipoprotein/Apolipoprotein-Profile with the Results of Coronary Angiography
J Clin Chem Clin Biochem 19: 642-643 (1981)

26 Curry M D, Gustafson A, Alaupovic P and Conathy W J.
Electroimmunassay, radioimmunassay and radial immundiffusion evaluated for quantitation of human Apolipoprotein B
Clin Chem 24: 280-311 (1978)

27 De Lalla O and Gofman J W.
Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins
Meth Biochem Anal 1: 459-478 (1959)

28 Documenta Geigy.
Wissenschaftliche Tabellen
J R Geigy AG, Basel 7: (1968)

29 Draeger B, Wahlfeld A.
Entwicklung des Tests zur HDL-Cholesterin-Bestimmung über Präzipitation in Lipoproteine und Herzinfarkt
Witzstrock-Verlag Baden-Baden 39-44 (1979)

30 Drygas J. Ist LDL-C ein eigenständiges Kriterium in der Lipiddiagnostik?
Lab med 4: 15-18 (1980)

31 Dupont Instruments
ACA Analytical Test Packs Cholesterol
Gebrauchsanweisung (1978)

32 Dupont Instruments
Handbuch- Anweisungen für den ACA (1980)

33 Eggstein M. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe: II.Mitteilung
Klin Wschr 44: 267-278 (1966)

34 Eggstein M und Kreutz F H.
Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe: I. Mitteilung
Klin Wschr 44: 262-267 (1966)

35 Endler A T, Abel-Telkes B, Bauer K, Burger E, Gergely Th.
Vergleich verschiedener Techniken zur Bestimmung von Lipoprotrinen im Serum
Med Lab 34: 20-34 (1981)

36 Fievet-Desreumaux C, Dedonder-Decoopman E, Fruchart J, Dewailly P and Sezille G.
Immunochemical Determination of Human Apolipoprotein B by Laser Nephelometry
Clin Chim Acta 95: 143-153 (1980)

37 Finley P R, Schifman R B, Williams J, Lichti D A.
Cholesterol in high density lipoprotein.
Use of Mg^{++}/Dextransulfate in its
measurement
Clin Chem 24: 931-933 (1978)

38 Flegg H M. An investigation of the determination
of serum cholesterol by an enzymatic method
Am Clin Biochem 10: 79-83 (1973)

39 Fredrickson D S, Levy R I and Lees R S.
Fat transport in lipoproteins
An integrated approach to mechanism
and disorder
New England J of Med 276: (1967)
Medical Progress No 1, No 2, No 3,
No 4, No 5,

40 Friedewald W T, Levy R I, Fredrickson D S.
Estimation of the concentration of low
density lipoprotein cholesterol concen-
tration in plasma without use of the
preparative ultracentrifuge
Clin Chem 18: 499-509 (1972)

41 Girault A, Loiseau D, Girault M.
Die quantitative Bestimmung von Apolipo-
protein A im Humanserum mittels Laser-
Nephelometrie
Laboratoriumsblätter 30: 143-153 (1980)

42 Glomset J A. The plasma lecithin: cholesterol
acyltransferase reaction
J lipid Res 9: 155-167 (1968)

43 Glueck C J, Fallat R W Millet F, Gartside P, Elston R C and Go R C P.
Familial hyper - alpha - lipoproteinemia. Studies in eighteen kindreds
Metabolism 29: 1234-1241 (1975)

44 Glueck C J, Fallat R W, Spadafara M and Gartside D.
Longvity Syndroms
Circulation 52: 272-279 (1975)

45 Gordon T, Castelli W P, Jortland M C.
High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease.
The Framingham Study
The Am J of Med 62: 707-714 (1977)

46 Gordon T, Castelli W P, Jortland M C.
Predicting coronary heart disease in middle aged and older persons
The Framingham Study
J Am Med Assoc 238: 497-513 (1977)

47 Haeckel R. Statistische Verfahren beim Methodenvergleich
Med Lab 34: 8-14 (1981)

48 Heuck C C. Apolipoprotein B Bestimmung
Laboratoriumsblätter 27: 18-25 (1977)

49 Heuck C C und Schlierf G.
Nephelometry of apolipoproteins in human serum
Clin Chem 25: 221-225 (1979)

50 Höffken K, Bestek U, Sperber U, Schmidt C G.
Quantitation of Immun Complexes by Nephelometry
J Imm Methods 29: 237-244 (1979)

51 Immuno Diagnostika GmbH Heidelberg
Arbeitsanweisung zur Bestimmung der Apoproteine Apo AI, Apo AII und Apo B immunoneph Methodik (1981)

52 Immuno Diagnostika GmbH Heidelberg
Arbeitsanweisung zur Bestimmung der Apoproteine Apo AI, Apo AII und Apo B immunoneph Methodik (1983)

53 Immuno Diagnostika GmbH Heidelberg
Immuno-Video-Nephelometrie
Bedienungsanleitung (1981)

54 Immuno Diagnostika GmbH Heidelberg
Lipidophor all in 12
Arbeitsanweisung (1980)

55 Kahan J and Sunblad L.
Immunochemical determination of β-Lipoproteins
Scand J Clin Lab Invest 24: 61-68 (1969)

56 Kattermann R. Die enzymatische Bestimmung des Cholesterins im Serum
Der Internist 20: 201-203 (1979)

57 Kostner G M. Möglichkeiten und Problematik der Bestimmung von Lipoproteinen
in : Lipoproteine und Herzinfarkt
Witzstrock-Verlag, Baden-Baden 34-38 (1979)

58 Kostner G M, Avogaro P, Bittolon G, Cazzolato G.
The determination of HDL in the Lipoprotein laboratory: A comparison of screening methods
Clin Chem 25: 938-942 (1979)

59 Lees R S. Immunochemical assay of plasma low density lipoproteins
Science 169: 493.495 (1970)

60 Levy R I. Cholesterol, Lipoproteins, Apoproteins and Heart Disease: Present Status and Future Prospects
Clin Chem 27: 653-662 (1981)

61 Lindgren F T, Jensen L C, Hatch F T.
Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism
Wiley-Interscience, New York: 221-248 (1972)

62 Lopes-Virella M F, Stone P, Ellis S and Colwell J A.
Cholesterol determination in high density lipoprotein by three different methods
Clin Chem 23: 882-884 (1977)

63 Lopes-Virella M F, Virella G, Evans G, Malenkos S B and Colwell J A.
Immunonephelometric Assay of Human Apolipoprotein AI
Clin Chem 26: 1205-1208 (1980)

64 Lopez S A, Vial R, Balart L.
Effect of exercise and physical fitness on serum lipids and lipoproteins
Atherosclerosis 20: 1-14 (1974)

65 Mancini G, Carbovara A O, Heremanns J F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immundiffusion
Immunichem 2: 235-243 (1965)

66 Mertz D P, Göhrmann E. Lipoproteinanalytik
Med Klin 74: 866-870 (1979)

67 Mertz D P, Göhrmann E, Ostertag J.
Differentialeinsatz von Apolipoproteinen und Lipoproteinen als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko
Med Welt 32: 1611-1615 (1981)

68 Miller G J, Miller N E.
Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease
Lancet I: 16-18 (1975)

69 Miller N E, Thelle D S, Førde O H and Mjøs O D.
High density lipoprotein and coronary heart disease: A prospective case control study. The Thromsø Heart Study
Lancet I: 965-968 (1977)

70 Mjøs O D. High density lipoprotein and coronary heart disease
Scand J clin Lab Invest 37: 191-199 (1977)

71 Mjøs O D, Thelle D S, Førde O H and Vikmo H.
Family-study of high density lipoprotein cholesterol and the relationship to age and sex. The Thromsø Heart Study
Acta Med Scand 201: 323-329 (1977)

72 Munz E, Jilek F. Erfahrung bei der methodischen Evaluierung der HDL-Chol-Bestimmung
in: Lipoproteine und Herzinfarkt
Witzstrock-Verlag Baden-Baden 49- 54 (1979)

73 Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Müller P, Baggio G und Seidel D.
Improved assessment of Plasma Lipoprotein Patterns. III. Direct Measurement of Lipoproteins after Gel-Electrophoresis
Clin Chem 23: 1296-1300 (1977)

74 Patch J R, Gotto A M Jr.
Die Rolle von High-Density Lipoproteinen im Katabolismus triglyzeridreicher Lipoproteine
in: Lipoproteine und Herzinfarkt
Witzstrock-Verlag Baden-Baden 17-22 (1979)

75 Pometta D, Micheli H, Jornot C, Scherrer J R.
HDL-cholestérol abaissé chez les proches parents et malades victimes d'infarctus du myocarde
Schweiz Med Wschr 108: 1888-1891 (1978)

76 Reimer C B. Progress towards international reference standards for human serum proteins
J Biol Stand 6: 133-158 (1978)

77 Reyzig E. Statistische Methoden und ihre Anwendungen
Verleg Vandenhoeck und Ruprecht 5 (1975)

78 Rick W. Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
New York 2: 192-194 (1973)

79 Röschlau P, Bernt E, Gruber W.
Enzymatische Bestimmung des Gesamt-cholesterins im Serum
J Clin Chem Clin Biochem 12: 403-407 (1974)

80 Rosseneu M, Vercaemst R, Vinaimont N, Van Tornout P, Henderson L O, Herbert P N.
Quantitative Determination of Human Plasma Apolipoprotein AI by Laser Immunonephelometry
Clin Chem 27: 856-859 (1981)

81 Schettler G, Nüssel E, Buchholz I.
Epidemiological research in Western Europe
Atherosclerosis Rev 3: 2o3-211 (1978)

82 Schlierf G. Fettstoffwechsel
in: Klinische Pathophysiologie
Herausgeber: von Siegenthaler
Thieme Verlag Stuttgart (1976)

83 Seidel D, Wieland H and Ruppert C.
Improved Techniques for Assessment of Plasma Lipoprotein Patterns. I. Precipitation in Gels after Electrophoresis with Polyanionic Compounds
CLin Chem 19: 737-739 (1973)

84 Sheperd J, Packard R, Patsch R, Gotto A M Jr Taunton O D.
Effects of nicotinic acid therapy on plasma high density lipoprotein subfraction distribution and composition and on apolipoprotein A metabolism
J Clin Invest 63: 858-867 (1979)

85 Sieber A. Bestimmung von Proteinen mit Hilfe der Lasernephelometrie
Krankenhausarzt 52: 858-862 (1979)

86 Statistisches Jahrbuch der Bundesrepublick: 374-377(1979)

87 Steele B W, Koehler D F, Azar M M.
Enzymatic determinations of cholesterol in high-density-lipoprotein fractions prepared by a precipitation technique
Clin Chem 22:98-101 (1976)

88 Steinmetz J, Panek E, Siest G.
Personal and Familial Factors in Cholesterinemia
Clin Chem 126: 219-226 (1980)

89 Stössel J P. Wie ensteht Arteriosklerose?
Med Klin 75: 348-357 (1980)

90 VerganiC, Trovato G, Dioguardi N.
Serum Total Lipids, Lipoproteins Cholesterol, Apoproteins A and B in Cardiovascular Disease
Clin Chim Acta 87: 127-133 (1978)

91 Warnick G R, Cheung M C and Albers J J.
Comparison of current methods for HDL-methology
Clin Chem 25: 596-604 (1979)

92 Weinstock N, Bartholomé M, Seidel D.
Determination of Apolipoprotein AI by kinetic nephelometry
Biochim et Biophys Acta 633: 279-283 (1981)

93 Weißhaar H D, Jilek F.
Erfahrung bei der klinischen Evaluierung der HDL-Chol-Bestimmung
in: Lipoproteine und Herzinfarkt
Witzstrock-Verlag Baden Baden 55-60 (1979)

94 Whane T F, Alaupovic P, Curry M D, Lee E T, Anderson P, Schechter E.
Plasma apolipoprotein B and VLDL-, LDL- and HDL-Cholesterol as risk factor in the developement of angiography
Atherosclerosis 39: 411-424 (1981)

95 Wieland H, Niazi M, Bartholomé M, Seidel D.
A new method of measurement of plasma-lipoproteins; A clinical evaluation
Presented at V. International Symposium on Atherosclerosis
Houston, 6th-9th November 1979

96 Wieland H, Niazi M, Bartholomé M und Seidel D.
Eine neue Methode zur Messung von Plasmalipoproteinen
Ärztl Lab 26: 1-10 (1980)

97 Wieland H, Seidel D.
A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins
J lipid Res 24: 904-909 (1983)

98 Wieland H, Seidel D.
Fortschritte in der Analytik des Lipoproteinmusters
Inn Med 5: 290-300 (1978)

99 Wieland H and Seidel D.
Improved Techniques for Assessment of Serum Lipoprotein Patterns. II. Rapid Method for Diagnosis of Type III Hyperlipoprotrinemia without Ultracentrifugation
Clin Chem 19: 1139-1141 (1973)

100 Wolfram G, Schlierf G.
LDL-Chol und HDL-Chol Risikofaktor und Schutzfaktor?
Internist 20: 613-618 (1979)

101 Wood P D, Klein H, Lewis S.
Plasma lipoprotein concentration in middle aged runners
Circulation 50: 11-17 (1974)

102 Zilversmit D. A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglycerid-rich lipoproteins
Circulat Res 33: 633 639 (1973)

103 Zimmer F, Riebeling V, Benke B, Schuster J und Roskamm H.
Das LDL-HDL-Verhältnis bei Patienten mit Koronarsklerose
Z Kardiol 69: 149-153 (1980)

L E B E N S L A U F

Name:	Pils
Vornamen:	Wolfgang Johannes
geboren am:	24.11.52
in:	Karlsruhe
wohnhaft:	Erzbergerstr. 97 7500 Karlsruhe
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

1959-1963	Grundschule in Karlsruhe
1963-1964	Realschule in Karlsruhe
1964-1972	Gymnasium in Karlsruhe Abschluß: Abitur
1974-1976	Ausbildung zum MTL in Tübingen Abschluß: Staatsexamen
1977-1982	Medizinstudium an den Universitäten Heidelberg und Tübingen
1982-1983	Praktisches Jahr an den Städtischen Krankenanstalten Esslingen, Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen Abschluß: Staatsexamen am 19.10.83 Dissertationsschrift: Verschiedene immunologische Verfahren der Apolipoproteinbestimmung im Methodenvergleich und als Diskriminatoren für ein atherogenes Risiko

Berufstätigkeit:

1972-1973	Wehrdienst beim Gebirgssanitätsbat. 8
1976-1977	als MTL an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abt. IV, Prof. Dr. M. Eggstein, Labor

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45